T H E S E S

présentées

A LA FACULTE DES SCIENCES

DE L'UNIVERSITE DE STRASBOURG

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR ES SCIENCES

par

Marie-Louise B A C H

---

Première Thèse

ETUDE DE L'ACTION DE DIVERS AGENTS SUR L'ADN TRANSFORMANT D'HEMOPHILUS INFLUENZAE

Deuxième Thèse

PROPOSITION DONNEE PAR LA FACULTE

---

Soutenue le 9 Février 1968 devant la Commission d'Examen:

| | | |
|---|---|---|
| MM. | L. HIRTH | Président |
| | F. LACROUTE | Examinateurs |
| | G. BERNARDI | |
| | C. ANAGNOSTOPOULOS | |
| Mme | D. LUZZATI | Invités |

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552711_0013

T H E S E S

présentées

A LA FACULTE DES SCIENCES

DE L'UNIVERSITE DE STRASBOURG

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR ES SCIENCES

par

Marie-Louise B A C H

---

Première Thèse

ETUDE DE L'ACTION DE DIVERS AGENTS SUR L'ADN TRANSFORMANT D'HEMOPHILUS INFLUENZAE

Deuxième Thèse

PROPOSITION DONNEE PAR LA FACULTE

---

Soutenue le 9 Février 1968 devant la Commission d'Examen:

| | | |
|---|---|---|
| MM. | L. HIRTH | Président |
| | F. LACROUTE | Examinateurs |
| | G. BERNARDI | |
| | C. ANAGNOSTOPOULOS | |
| Mme | D. LUZZATI | Invités |

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

UNIVERSITE DE STRASBOURG
FACULTE DES SCIENCES

Edition de Novembre 1967

Doyen : Professeur J.H.VIVIEN
Doyens Honoraires : A.KIRRMANN, P.LACROUTE, H.J.MARESQUELLE, G.MILLOT.
Professeurs Honoraires : P.DE BEAUCHAMP, L.BOISSELET, H.CARTAN G.CERF, C.CHABAUTY, A.CHRETIEN, J.DENY, Ch.EHRESMANN, M.FRECHET, H.GAULT, Mle S.GILLET, A.HEE, R.HOCART, A.KIRRMANN, G.LEMEE, P.L'HERITIER, A.LICHNEROWICZ, L.NEEL, Ch.SADRON, E.TERROINE, R.THIRY, H.VILLAT, H.WEISS, Et.WOLFF, J.YVON.
Maître de Conférences Honoraire : R.WEIL

Professeurs :

| | | |
|---|---|---|
| H.J.MARESQUELLE ..... | T. | Biologie végétale |
| A.ROUSSEL ..... | T. | Calcul différentiel et intégral et théorie des fonctions |
| H.FORESTIER ..... | T. | Chimie générale |
| J.ROTHE ..... | T. | Physique du Globe |
| P.LACROUTE ..... | T. | Astronomie |
| J.H.VIVIEN ..... | T. | Zoologie et Embryologie expérimentale |
| A.MAILLARD ..... | T. | Physicochimie du Pétrole |
| S.GORODETZKY ..... | T. | Physique générale et Physique nucléaire |
| L.SACKMANN ..... | T. | Mécanique des Fluides |
| J.BYE ..... | T. | Chimie Physique |
| R.LOMBARD ..... | T. | Chimie organique |
| Mle M.PEREY ..... | T. | Chimie nucléaire |
| S.GOLDSZTAUB ..... | T. | Minéralogie et Pétrographie |
| P.JOLY ..... | T. | Biologie générale |
| H.BENOIT ..... | T. | Physicochimie macromoléculaire |
| P.CUER ..... | T. | Physique générale et physique corpusculaire |
| G.MILLOT ..... | T. | Géologie et Paléontologie |
| R.LECOLAZET ..... | T.T.P. | Physique du Globe |
| H.SAUCIER ..... | T.T.P. | Minéralogie |
| R.ROHMER ..... | T. | Chimie minérale |
| Mle A.GAGNIEU ..... | T.T.P. | BOtanique |
| S.NIKITINE ..... | T. | Physique générale |
| F.STUTINSKY ..... | T. | Physiologie générale |
| B.WURTZ ..... | T.T.P. | Chimie Biologique |
| J.BRENET ..... | T. | Electrochimie |
| G.OURISSON ..... | T.T.P. | Chimie |
| A.COCHE ..... | T.T.P. | Physique nucléaire |
| R.CERF ..... | T. | Physique générale |
| J.FRENKEL ..... | T.T.P. | Mathématiques |
| P.TAGLANG ..... | T. | PHysique |

| | |
|---|---|
| J.P.LONCHAMP ..... | T.T.P.Physique |
| A.DELUZARCHE ..... | T.T.P.Chimie |
| J.B.DONNET ..... | T.T.P.Chimie Physique |
| R.ARMBRUSTER ..... | T.T.P.Physique |
| A.ROCHE ..... | T.T.P.Physique du Globe |
| L.HIRTH ..... | T. Microbiologie |
| A.SIGOT ..... | T.S.C.Zoologie |
| J.COGNE ..... | T.T.P.Géologie |
| A.FUCHS ..... | T. Mécanique rationnelle |
| A.GALLMANN ..... | T.T.P.Physique |
| P.MIALHE ..... | T.T.P.Phsiologie animale |
| J.P.EBEL ..... | T. Chimie biologique |
| J.PARROD ..... | T.T.P.Chimie |
| R.WEY ..... | T.T.P.Chimie |
| Mme D.MAGNAC ..... | T.T.P.Physique |
| M.DAUNE ..... | P.S.C.Physique |
| J.P.ADLOFF ..... | T.T.P.Chimie nucléaire |
| D.BERNARD ..... | T.T.P.Méthodes mathématiques de la physique |
| M.ZISMAN ..... | T.T.P.Mathématiques |
| E.DANIEL ..... | T. Physique expérimentale |
| P.CHEVALLIER ..... | T. Physique |
| J.GREMILLARD ..... | T.T.P.Mécanique des Fluides |
| P.CARTIER ..... | T. Mathématiques M.P.C. |
| G.REEB ..... | T. Topologie |
| F.NORGUET ..... | T. Analyse supérieure |
| R.CHAUVIN ..... | T. Psychophysiologie |
| J.WUCHER ..... | P.S.C.Physique |
| Mme M.BRINI ..... | P.S.C.Chimie |
| G.PERNY ..... | P.S.C.Physique |
| R.BARO ..... | P.S.C.Physique |
| H.DURANTON ..... | P.S.C.Botanique |
| R.WEISS ..... | T.T.P.Chimie |
| P.FEDERLIN ..... | T.T.P.Chimie |
| J.LERAY ..... | P.S.C.Physique |
| J.P.SCHWING ..... | P.S.C.Chimie |
| M.SIESKIND ..... | P.S.C.Physique |
| G.MONSONEGO ..... | P.S.C.Physique mathématique |
| P.GABRIEL ..... | T.T.P.Mathématiques |
| C.WIPPLER ..... | T. Physicochimie des Hauts Polymères industriels |
| P.A.MEYER ..... | T.T.P.Mathématiques |
| G.WEILL ..... | P.S.C.Physique |
| J.M.BLOCH ..... | T. Chimie |
| A.CLAUSS ..... | P.S.C.Chimie |
| E.FOLLENIUS ..... | P.S.C.Zoologie |
| J.LUCAS ..... | P.S.C.Géologie |
| G.GLAESER ..... | T. Mathématiques |
| J.J.THIEBOLD ..... | P.S.C.Biologie animale |

Professeurs Associés :

S.R. DE GROOT ..... Physique
K.VESELY ..... Physicochimie macromoléculaire
R.MARCHESSAULT ..... Physicochimie macromoléculaire
G.LUMER ..... Mathématiques
R.MORIARTY ..... Chimie organique
J.AUSLANDER ..... Physique corpusculaire

Maîtres de Conférence :

H.DANAN ..... Physique
Mme WINTER Ch. ..... Physique
J.P.EBERHART ..... Minéralogie
Mme D.CAGNIANT ..... Chimie
X.FERNIQUE ..... Mathématiques
J.STREITH ..... Chimie
J.H.WEIL ..... Chimie Biologique
F.GAUTIER ..... Physique propédeutique
G.SUTTER ..... Physique électronique
D.FOATA ..... Mathématiques
J.L.VERDIER ..... Mathématiques
J.M.LEHN ..... Chimie
Cl.ROBERT ..... Physique
Mr.LACROUTE ..... Biologie végétale
M.GOUNOT ..... Botanique
J.PRADINES ..... Mathématiques
A.GIRARDIE ..... Biologie animale
F.BECKER ..... Physique mathématique
J.DEHAND ..... Chimie minérale
Cl.GODBILLON ..... Mathématiques
M.KAROUBI ..... Mathématiques
A.MIGNOT ..... Mathématiques appliquées

Maîtres de conférences Associés :

V.AVANISSIAN ..... Mathématiques
R.A.MASSY-WESTROPP ..... Chimie organique
Ch.JEFFORD ..... Chimie organique

Secrétaire : G.SAINT-PE

A mes Parents

Le présent travail a été réalisé au Centre de Recherches sur les Macromolécules à Strasbourg. Que Monsieur C. Sadron, Directeur du Centre de Biophysique Moléculaire d'Orléans, qui a accepté d'en assurer la direction scientifique, trouve ici l'expression de ma profonde et respectueuse gratitude.

Madame D.Luzzati , Maître de Recherches au CNRS, m'a accueillie dans son groupe de recherche. Je voudrais lui en exprimer ma très vive reconnaissance. Elle m'a initié à la transformation bactérienne et a guidé et suivi de très près toute la première partie de ce travail.

Je voudrais remercier très sincèrement Monsieur G.Bernardi, Maître de Recherches au CNRS, de m'avoir permis d'étudier l'action de différents enzymes, préparés et étudiés dans son laboratoire.
Ses conseils et ses connaissances, dont il m'a largement fait bénéficier, m'ont été d'un grand profit.

Madame M.R.Chevallier, Chargée de Recherches au CNRS, a accordé à mon travail un bienveillant intérêt. Par les nombreux conseils qu'elle m'a prodigués au cours du développement de ces recherches, par ses constants encouragements et son aide précieuse, elle m'a permis de mener à bien le travail entrepris. Je voudrais lui exprimer ici ma profonde reconnaissance.

De nombreuses personnes sont associées à la réalisation de ce travail, et je les en remercie toutes chaleureusement.
Une partie des recherches a été entreprise en collaboration avec R.Litzler ; elle a permis des échanges intéressants et fructueux.
Et je suis très heureuse d'avoir l'occasion de remercier tout

spécialement Monsieur P.Le Panse et Mlle B.Nubel pour leur précieux concours dans la réalisation de nombreuses expériences.

Ce travail est lié au CRM et à tous ceux qui par leur sympathie ou l'intérêt qu'ils lui ont manifesté l'ont rendu agréable.

P L A N


INTRODUCTION 1

TRANSFORMATION BACTERIENNE - SYSTEME TRANSFORMANT DE HEMOPHILUS INFLUENZAE 4

METHODES EXPERIMENTALES ET EXPLOITATION DES DONNEES EXPERIMENTALES 18

I. LA TRANSFORMATION DE H.INFLUENZAE 18

Matériel 18

Méthodes 24

Résultats expérimentaux et exploitation des résultats 31

II. ETUDE DES PROPRIETES PHYSIQUES DES ADN TRANSFORMANTS 37

Mesures de viscosité 37

Mesures de sédimentation 39

Mesures de Diffusion de lumière 39

Exploitation des données expérimentales 4o

III. ACTION DES DIFFERENTS AGENTS ETUDIES SUR L'ADN D'HEMOPHILE. CONDITIONS EXPERIMENTALES 43

Traitements par le peracide succinique 43

Traitements par les ultra-sons 46

Traitements par DNAses 49

ETUDE EXPERIMENTALE ET RESULTATS 55

1ère PARTIE : Action du peracide succinique sur l'ADN d'Hemophile 55

2ème PARTIE : Action des ultra-sons sur l'ADN d'Hemophile 83

3ème PARTIE : Action de la DNAse acide sur l'ADN d'Hemophile 114

CONCLUSIONS GENERALES 148

## LEGENDE DES FIGURES

### 1ère PARTIE ACIDE PERSUCCINIQUE

Figures 1-2 et 3 Inactivation des marqueurs liés de H.influenzae par l'acide persuccinique

### 2ème PARTIE ULTRA-SONS

Figure 1 Dépolymérisation de l'ADN d'Hemophile par ultra-sons

Figure 2 Inactivation de l'ADN d'Hemophile par les ultra-sons, testée à concentration saturante (ADN 1µg/ml) et à concentration non saturante (ADN $10^{-2}$µg/ml) d'ADN dans le milieu de transformation

Figures 3 4 Chute de la masse et de l'activité transformante de l'ADN d'Hemophile au cours de traitement par ultra-sons.

Figure 5 Activité transformante de l'ADN d'Hemophile (marqueur N) en fonction de la chute de masse de l'ADN au cours de l'action des ultrasons

Figure 6 Activité transformante de l'ADN d'Hemophile en fonction du temps d'action des ultra-sons

Figure 7 Inactivation des marqueurs liés de l'Hemophile S,K et N

Figures 8 9 10 Inactivation des marqueurs et groupe de marqueurs liés de l'Hemophile

Figures 11 12 Pouvoir compétitif d'ADN d'Hemophile traité par ultra-sons

Figure 13 Inactivation du marqueur N de l'Hemophile en fonction du nombre de ruptures dépolymérisantes introduites dans la molécule d'ADN

3ème PARTIE DNAses

Figures 1 2 Dépolymérisation de l'ADN d'Hemophile par la DNAse acide et la DNAse pancréatique

Figure 3 Dépolymérisation et inactivation de l'ADN d'Hemophile par la DNAse acide et par la DNAse pancréatique

Figure 4 Inactivation de l'ADN d'Hemophile (marqueur N)par la DNAse acide et par la DNAse pancréatique en fonction de la dépolymérisation de l'ADN

Figure 5 Diminution de l'activité transformante de l'ADN d'Hemophile (marqueur N) en fonction du nombre de ruptures diplotomiques de l'ADN produites par la DNAse acide.

Figure 6 Inactivation des marqueurs N et S et du groupe de marqueurs liés SN au cours des traitements de l'ADN d'Hemophile par DNAse acide et par DNAse pancréatique. Effets sur la liaison des marqueurs N et S

Figure 7 Inactivation des marqueurs N et S et du groupe de marqueurs liés SN en fonction de la dépolymérisation de l'ADN d'Hémophile par la DNAse acide

Figure 8 Dégradation de l'ADN d'Hemophile ($N_2A$ 366) par la DNAse acide à pH5 et par la DNAse pancréatique.
Dépolymérisation, perte de pouvoir compé-

titif, inactivation.

Figure 9 Diminution du pouvoir compétitif de l'ADN transformant d'Hemophile traité par DNAse acide et par DNAse pancréatique

# INTRODUCTION

La transformation bactérienne est une technique extrêmement sensible pour la détection de lésions dans l'ADN (acide désoxyribonucléique); elle met en évidence des modifications même ponctuelles dans la structure primaire de l'ADN; elle est sensible également à la structure secondaire. Lorsque nous avons abordé ce travail, les connaissances sur son mécanisme intime étaient décrits par H.EPHRUSSI-TAYLOR (1958-1961). P.SCHAEFFER (1961) en précisait les différentes étapes.

De nombreuses études ont fait progresser, depuis, l'état de nos connaissances sur les phénomènes qui ont lieu au cours de la transformation de différentes espèces bactériennes. Nous en rappellerons les points essentiels dans un premier chapitre.

Nous avons étudié, par cette technique, les effets, inactivants et mutagènes, de l'action de différents agents sur l'ADN traité in vitro; cette étude à été faite en vue d'analyser les effets de 2 types de lésions sur les propriétés biologiques de l'ADN :

des lésions touchant les bases de l' ADN
des lésions dépolymérisantes.

Ces lésions ont été introduites dans l'ADN transformant de Hemophilus influenzae et leurs effets ont été étudiés en mettant à profit l'existence de 3 marqueurs liés dans ce système de transformation.

Des études similaires, réalisées sur l'ADN transformant de Diplococcus pneumoniae, étaient publiées au moment où nous commencions ce travail et nous laissaient espérer des résultats intéressants: ainsi R.LITMAN analyse en 1961 des résultats

concernant l'action inactivante et mutagène de l'acide nitreux et des rayons U.V. sur l'ADN, alors que M.LITT, J.MARMUR, H.EPHRUSSI-TAYLOR et P.DOTY avaient étudié l'inactivation de l'ADN en fonction de sa chute de masse à la suite de traitements par ultra-sons (1958).

L'étude expérimentale qui fait l'objet de ce travail peut par conséquent être divisée en 2 parties qui ont trait à l'action sur l'ADN de 2 catégories d'agents chimiques et physiques :

- les uns agissent essentiellement sur les bases de l'ADN et ne dégradent pas de façon appréciable la chaîne polynucléotidique de l'ADN. On leur a attribué des effets mutagènes sur des organismes vivants. Nous nous sommes donc proposés de préciser dans quelle mesure leur effet mutagène a lieu par action directe sur l'ADN et d'étudier par la suite les mécanismes de cette action mutagène. Leur action inactivante a également été analysée.

Nous décrirons dans cette première partie, les résultats que nous avons obtenus dans l'étude de l'action inactivante et mutagène de l'acide persuccinique sur l'ADN d'H.influenzae.

Nous avions entrepris d'autres études en vue d'analyser, de même, l'action, sur l'ADN, de l'hydroxylamine et de certains agents alkylants : diméthylsulfate, chlorohydroxy diéthylsulfide. Nous ne ferons que les mentionner ici car mis à part l'effet inactivant que nous en attendions, ces agents n'ont pas manifesté d'action mutagène sur l'ADN d'Hémophile.

- les autres agents ont été choisis pour leur action dépolymérisante sur l'ADN. Il était intéressant de connaître l'effet inactivant d'une coupure d'une molécule d'ADN. Nous espérions trouver ainsi une technique qui permette de fractionner l'ADN en segments biologiquement actifs. Il devenait alors possible

d'envisager l'obtention de petits segments d'ADN, adaptés à l'étude de la structure responsable d'un caractère génétique.

Nous avons étudié l'effet inactivant, d'une part des ultra-sons, et d'autre part de la DNase acide de rate de porc, en fonction de leur action dépolymérisante sur l'ADN. Nous avons précisé dans quelle mesure les ruptures dépolymérisantes étaient à même de séparer, sans les inactiver, les 2 marqueurs S et N de H.influenzae, portés initialement par la même molécule d'ADN.

La transformation de H.influenzae par de l'ADN préalablement soumis à l'action des agents que nous avons cités, nous a permis de mettre en évidence les effets des lésions introduites dans l'ADN, sur l'activité transformante de ses marqueurs génétiques. Des études chimiques et/ou physiques ont été faites parallèlement sur l'ADN traité, en vue de déterminer la nature et le nombre de lésions, lésions de bases ou lésions dépolymérisantes, introduites respectivement, par ces agents, dans l'ADN.

Ceci nous a permis d'évaluer l'effet inactivant d'une lésion de chaque type; de leur comparaison nous avons tiré des données nouvelles sur le mode et "l'efficacité" d'action des différents agents étudiés. L'incidence de ces lésions sur le mécanisme de la transformation a également été précisé.

TRANSFORMATION BACTERIENNE

SYSTEME TRANSFORMANT DE HEMOPHILUS INFLUENZAE

## TRANSFORMATION BACTERIENNE

Découverte par F.GRIFFITH (1928) lors d'expériences sur Diplococcus pneumoniae, la transformation bactérienne a pu être réalisée par la suite sur un nombre restreint de souches bactériennes, et essentiellement sur Hemophilus Influenzae (H.E.ALEXANDER et G.LEIDY 1950-51) et sur Bacillus Subtilis (J.SPIZIZEN 1958).

La transformation bactérienne consiste en un transfert d'information génétique d'une bactérie à une autre bactérie, par l'intermédiaire de l'ADN homologue, extrait de la bactérie qui porte l'information transmise.

La transformation pose donc comme préalable la possibilité, pour des molécules d'ADN, de pénétrer dans les cellules bactériennes; celles-ci doivent se trouver dans un état physiologique particulier, encore mal connu, qui leur confère la "compétence". La difficulté d'obtention des bactéries à l'état réceptif est la raison de la rareté avec laquelle on observe ce phénomène chez les bactéries.

La mise en évidence que la transformation est due à de l'acide deoxyribonucléique est l'oeuvre de O.T.AVERY (O.T.Avery, M.Mc Leod et M.Mc Carty 1944).

Lorsque l'on met en présence, dans les conditions appropriées, de l'ADN purifié et des bactéries compétentes, il y a successivement :

- Fixation de l'ADN sur des sites particuliers de la membrane bactérienne.
- Pénétration de l'ADN dans la bactérie.
- Intégration de l'ADN dans le génome de la bactérie réceptrice.

Elle a lieu après appariement spécifique de la molécule d'ADN avec la structure nucléotidique homologue du matériel génétique bactérien, et résulte en une incorporation d'informations nouvelles, apportées par l'ADN exogène, dans le patrimoine héréditaire de la bactérie.

- Expression phénotypique des caractères acquis par le génome bactérien.

La replication de l'ADN de la bactérie transformée et l'induction des modifications biochimiques spécifiés par les nouveaux caractères de la bactérie sont nécessaires au maintien, dans la descendance, des caractères acquis.

Tous les caractères génétiques portés par un ADN transformant, sont susceptibles d'être, ainsi, transmis à des bactéries compétentes. En fait, le nombre de caractères transmis, au cours de la transformation bactérienne est restreint.

Le taux de transformation d'un ADN dépend

1°) de la préparation d'ADN transformant

Hemophilus influenzae contient, par bactérie, $1{,}35.10^{-9}$ à $2{,}5 . 10^{-9}$ µg d'ADN. Cet ADN correspond probablement à un seul chromosome, ayant une masse moyenne en poids de $8.10^8$ à $1{,}5.10^9$ daltons (K.I.Berns et C.A.Thomas Jr.,1964; L.A.Mc HATTIE, K.T. Berns et C.A.Thomas Jr., 1964).

Etant donné que la masse moyenne en poids de la plupart de nos préparations d'ADN varie entre $8.10^6$ et $12.10^6$ daltons, chaque "molécule" d'ADN correspond approximativement à 1/100ème du génome d'une bactérie. Un marqueur génétique ne sera donc porté que par 1 molécule sur 100 d'une préparation d'ADN transformant.

K.I.BERNS et C.A.THOMAS Jr. (1964) ont extrait de l'Hémophile, de l'ADN de masse $400.10^6$. L'activité transformante de cet ADN, pour 4 marqueurs génétiques, est supérieure de 25% à 50% à celle de la même préparation d'ADN dont la masse a été réduite (par "shearing") à $16.10^6$ daltons.

Mais l'importance de la taille des molécules apparait surtout lorsqu'on étudie les propriétés transformantes de préparations d'ADN de faible masse. M.LITT et coll. (1957) ont calculé que la masse de $1.10^6$ est une masse critique dans la transformation bactérienne, masse qui est nécessaire soit pour que la molécule d'ADN puisse se fixer sur les sites bactériens, soit pour qu'elle soit intégrée dans l'ADN bactérien. Certains de nos résultats expérimentaux apportent des données supplémentaires à ce sujet.

2°) du nombre de récepteurs bactériens

Des estimations du nombre de ces sites, par bactérie, ont été faites par différents auteurs :

selon B.J.BARNHART et R.M.HERRIOTT (1963) il y en aurait 27 chez l'Hémophile, M.S.FOX et R.D.HOTCHKISS (1957), évaluent ce nombre à 33-70 chez le Pneumocoque.

Le nombre de sites étant limité, on peut déterminer pour un système de transformation donné, une concentration limite d'ADN pour laquelle on atteint la saturation de tous les sites réceptifs bactériens.

Cette concentration limite dépend des caractères physico-chimiques de la préparation d'ADN transformant et du degré de compétence des bactéries réceptrices.

Lorsqu'on détermine le taux de transformation d'un ADN en fonction de sa concentration dans le milieu transformant, on observe que le taux de transformation augmente linéairement en fonction du logarithme de la concentration d'ADN, puis s'incurve et aboutit à un plateau qui correspond à la limite supérieure du taux de transformation dans les conditions utilisées. Dans nos conditions expérimentales le plateau est atteint lorsque la concentration en ADN est de l'ordre de 0,1 µg/ml de

milieu (contenant 1,5 - 2,5 . $10^9$ bactéries). A la concentration de 1 µg/ml l'ADN se trouve à saturation dans le milieu transformant; à $10^{-2}$ µg/ml et à concentration plus faible la transformation a lieu à concentration non saturante d'ADN.

Au dessous de la saturation toutes les molécules d'ADN susceptibles de se fixer sur les bactéries ont la possibilité de manifester leur pouvoir transformant.

Au dessus de la saturation, par contre, l'excès de molécules d'ADN peut avoir comme conséquence une fixation préférentielle de certaines molécules sur les bactéries. C'est ce que certaines de nos données expérimentales, provenant de tests de compétition, préciseront par la suite.

R.D.HOTCHKISS (1954) et G.LEIDY et E.HAHN(1954) ont montré qu'on peut inhiber l'activité transformante d'un ADN en ajoutant des concentrations saturantes d'un autre ADN dans le milieu de transformation; l'inhibition est de type compétitif. P.SCHAEFFER a précisé par la suite (1957) que c'est pour les sites récepteurs des bactéries que joue la compétition entre les molécules d'ADN. Il est donc possible en étudiant le pouvoir compétitif d'un ADN : ADN homologue ou hétérologue par rapport à l'ADN transformant, ADN natif ou dégradé, de préciser son pouvoir de fixation sur les sites récepteurs bactériens, première étape de la transformation (P.SCHAEFFER , 1961).

Notons que dans les conditions habituelles de transformation, la structure en double hélice est requise pour la fixation, puis la pénétration de l'ADN dans les bactéries; ceci a été mis en évidence par L.S.LERMAN et L.J.TOLMACH (1957-1959) chez D.pneumoniae, par F.E.YOUNG et J.SPIZIZEN(1961) chez B. subtilis et par B.J.BARNHART et R.M.HERRIOTT (1963) chez H.influenzae.

3°) du nombre de molécules pénétrant à l'intérieur d'une bactérie

Ce nombre est inférieur à celui des molécules fixées sur les sites récepteurs des bactéries; il a été également soumis à des évaluations chez l'Hémophile, par S.H.GOODGAL et R.M.HERRIOTT (1961), et par B.J.BARNHART et R.M.HERRIOTT (1963) : à concentration saturante d'ADN, 4 à 7 molécules, au moins, pénétreraient dans une bactérie au cours d'une transformation.

Ces molécules, qui étaient auparavant liées réversiblement à la bactérie-et pouvaient en être détachées -, sont alors liées à elle irréversiblement.

L.S.LERMAN et L.J.TOLMACH (1957) ont montré que le taux de transformation est lié directement à la quantité d'ADN qui a pénétré dans les bactéries.

4°) de l'appariement entre l'ADN transformant et l'ADN bactérien

Le taux de transformation dépend de la longueur des segments d'ADN appariés; la rareté des transformations bactériennes par un ADN hétérologue est dûe, en effet (P.SCHAEFFER,1958) à la taille restreinte des régions homologues de l'ADN exogène et de l'ADN bactérien, ce qui empêche leur appariement sur de longues distances.

Selon P.SCHAEFFER la fréquence de transformation serait liée à la perfection de la synapse entre ADN transformant et ADN récepteur. Une structure polynucléotidique intacte de l'ADN serait donc très importante pour la réalisation de cette étape de la transformation

L'appariement ne se fait que sur une partie de l'ADN qui a pénétré dans la bactérie (L.S.LERMAN et L.J.TOLMACH 1957). Une fraction de l'ADN lié irréversiblement à la bactérie est dégradée dans la bactérie préalablement à l'étape de l'intégration (N.NOTANI et S.H.GOODGAL 1966). J.H.STUY(1965) estime que chez H.influenzae, sur les 4 molécules qui ont pénétré dans la bactérie, 3 d'entre elles seraient dégradées dans les 10 minutes qui suivent leur pénétration.

5°) de l'intégration dans l'ADN bactérien de segments d'ADN transformant

Il est admis qu'entre les deux allèles, bactérien et exogène, ont lieu des crossing-over, comme c'est le cas au cours de la phase méïotique de la division chromosomique. Ainsi certaines parties de l'allèle exogène seulement seront intégrées dans le génome récepteur.

Les expériences de N.NOTANI et S.H.GOODGAL (1966) ont mis en évidencé que chez l'Hémophile également, comme chez D.Pneumoniae (M.S.FOX et M.K.ALLEN 1964) et chez B.subtilis (W.Bodmer et H.T.Ganesan,1964), un seul brins de l'ADN intervient dans les phénomènes d'intégration.

La taille des segments intégrés apparait comme étant très variable.

En conclusion,

le taux de transformation dépend :

- de la compétence des bactéries réceptrices, au sens large du terme; elle est, selon S.H.GOODGAL et R.M.HERRIOTT (1961), dépendante de toutes les étapes de la transformation puisqu'une modification dans une quelconque de ces étapes affecte la compétence d'une population bactérienne.
- de l'ADN transformant,
- de sa nature (ADN homologue/ADN hétérologue)
- de sa structure secondaire: ainsi l'ADN doit être sous forme de double hélice pour pénétrer dans les bactéries.
- de la taille des molécules d'ADN.

Ces paramètres sont ceux dont dépend l'activité transformante d'une molécule d'ADN lorsque celle-ci ne présente pas de lésion dans sa chaîne nucléotidique.

Le taux de transfert d'un caractère génétique, par un tel ADN dit "natif",est au plus de 1 à 5%.

Lorsqu'on introduit des lésions dans un ADN natif, la mise en présence d'ADN modifié peut perturber l'une ou l'autre de toutes les étapes de la transformation.

Nous avons, dans ce travail, étudié l'effet de divers types de lésions sur l'activité transformante de l'ADN d'Hémophile. Les lésions étudiées sont :

1°- des coupures de la double hélice d'ADN qui donnent lieu à une diminution de la masse de l'ADN.
2°- des ruptures d'un seul des 2 brins de la double chaîne polynucléotidique
3°- la formation de liaisons covalentes entre 2 bases proches de l'ADN, qui peuvent empêcher la séparation des 2 brins de l'ADN si les bases liées sont sur des brins opposés.
4°- des modifications chimiques, in situ, des bases de l'ADN.

Toutes ces lésions ont une répercussion sur l'activité transformante d'un ADN.

La diminution d'activité transformante qui en résulte peut être dûe :

- soit à un défaut de pénétration des molécules d'ADN lésées dans les bactéries
- soit à leur non-intégration dans l'ADN bactérien.

Nous nous sommes attachés à préciser ce qui, dans l'action inactivante des différents agents étudiés, dépend d'un effet sur l'une ou l'autre de ces 2 étapes.

## LE SYSTEME TRANSFORMANT DE L'HEMOPHILE

La transformation d'une bactérie résulte en une acquisition ou en une perte d'un ou de plusieurs caractères génétiques spécifiés par une région déterminée de l'ADN (cistron). Cette

région de l'ADN, portant le déterminant du caractère étudié est désigné communément sous le nom de "marqueur génétique".

Chez H. influenzae, un nombre restreint de marqueurs est analysable, en raison des problèmes que pose leur détection ; seuls des marqueurs de résistance à des antibiotiques peuvent être utilisés dans la transformation de l'Hémophile, cette bactérie autotrophe nécessitant pour sa croissance, des milieux riches et complexes, ce qui élimine la possibilité d'utilisation de marqueurs biochimiques.

En ceci ce système se distingue de ceux de B. subtilis et de D.pneumoniae.

Par contre il présente, par la possibilité d'étudier les trois marqueurs liés qu'il porte, un intérêt particulier.

Le génome d'une bactérie constitué par une molécule unique d'ADN est coupé en une centaine de molécules environ, donnant lieu à une préparation d'ADN dont la masse moyenne en poids est de l'ordre de $12.10^6$ d'altons. Chaque molécule de cette préparation ne peut porter qu'un certain nombre de déterminants génétiques de la bactérie. Cependant parmi les marqueurs de résistance de l'Hémophile, trois d'entre eux sont portés généralement par la même molécule d'ADN ; ce sont les marqueurs liés :

S : de résistance à la streptomycine
K : de résistance à la kanamycine
N : de résistance à la novobiocine

Par contre, les marqueurs

E : de résistance à l'érythromycine,
V : de résistance à la viomycine sont portés chacun par une molécule différente.

Le système des 3 marqueurs liés de l'Hémophile est utilisé par d'autres auteurs (R.M. HERRIOTT, 1961 : J.H.STUY, 1961) qui l'ont analysé et en ont donné une description qui est en large accord avec nos propres résultats (LUZZATI et coll.1961). Nous

n'en rappellerons par conséquent, ici, que les caractères essentiels.

Signalons tout de suite que le marqueur S que nous avons étudié est le même que le marqueur Sd de Stuy; d'autre part nous préciserons dès maintenant que nos résultats diffèrent de ceux des autres auteurs sur un point, et concernent la position attribuée au marqueur K dans le groupe de marqueurs liés; cette divergence sera précisée plus loin.

La fréquence de transformation simultanée par deux marqueurs, situés sur deux molécules différentes d'une préparation d'ADN, est très basse. Par contre, elle est élevée pour des marqueurs liés, et ceci d'autant plus que ces marqueurs sont plus proches sur la molécule d'ADN; c'est ce que montrent les résultats expérimentaux de transformation de bactéries sensibles par de l'ADN portant les 3 marqueurs de résistance S, K et N. (D. LUZZATI et coll.,1961).

Tableau 1

Transformation de bactéries Rd par de l'ADN Rd S K N

| Marqueurs examinés | Nombre de bactéries transformées (par ml de milieu de transformation) |
|---|---|
| S | $1,53 . 10^5$ |
| K | $1,9 . 10^5$ |
| N | $3.43 . 10^5$ |
| S et K | $1.38 . 10^5$ |
| S et N | $5.3 . 10^4$ |
| K et N | $3.4 . 10^4$ |
| S, K et N | $2.3 . 10^4$ |

Milieu de transformation: $3.10^8$ bactéries Rd en suspension dans 1 ml de ClNa 0,15 M tampon phosphate pH 7 0,01 M + 0,25 µg ADN Rd S K N. Expression des caractères acquis: en milieu solide pendant 2 heures (voir Méthodes). Concentration des antibiotiques dans le milieu sélecteur : S : 25µg/ml - K: 4µg/ml- N: 4µg/ml.

Les taux de transfert de résistance multiple, obtenus, par conséquent, lorsque l'expression des différentes résistances acquises est simultanée (tableau 1), sont donnés ci-dessous :

Tableau 2

| Marqueurs de référence | Transformations multiples (% du taux de transformation pour le marqueur de référence) | | | |
|---|---|---|---|---|
| | SK | SN | KN | SKN |
| S | 90 | 35 | | |
| K | 73 | | 18 | |
| N | | 15,5 | 10 | |
| SK | | | | 16,5 |
| SN | | | | 43,5 |
| KN | | | | 67,5 |

Ces résultats ont été confirmés par repiquages successifs de bactéries, parmi les bactéries précédemment sélectionnées (Tableau 1): les bactéries, transformées parl'ADN portant les 3 marqueurs et isolés sur gélose contenant un seul antibiotique (ou 2 antibiotiques), sont repiquées successivement sur gélose contenant un autre (ou 2 autres) antibiotiques. Ces repiquages successifs permettent de déterminer en plusieurs étapes la nature et le nombre de marqueurs liés, acquis par une bactérie au cours d'une transformation. Les taux de transformation multiples apparaissent alors comme étant les suivants :

Tableau 3

| Bactéries testées | Nombre de bactéries (sur 100 bactéries testées) ayant acquis la résistance à | | | |
|---|---|---|---|---|
| | S + K | S + N | K + N | S + K + N |
| S | 90 | 55 | | 25 |
| K | 90 | | 28 | |
| N | | | | |
| SK | | | | 40 |
| SN | | | | 85 |

Le taux de transfert de résistance multiple, obtenu par expression successive des différentes résistances acquises, est donc supérieur à celui qui est obtenu lorsque la bactérie doit exprimer simultanément les différentes résistances qu'elle a acquise.* Et, en effet, les différences entre les résultats des deux techniques sont surtout importantes lorsqu'on teste l'expression simultanée de plusieurs marqueurs, quelle que soit leur position respective dans l'ADN et leur nature. Lorsqu'on détecte les transformées multiples (expression simultanée : tableau 1) sur de la gélose contenant des doses plus faibles d'antibiotiques, leur nombre est alors plus proche de celui que l'on obtient lorsqu'on détecte successivement les résistances acquises. Il semble donc que lorsqu'une bactérie acquiert simultanément plusieurs marqueurs génétiques, elle a besoin de délais plus longs (temps d'expression) pour pouvoir exprimer tous les caractères nouvellement acquis.

Si nous considérons les résultats des tableaux 2 et 3, nous constatons que les marqueurs S et K sont transmis simultanément 9 fois sur 10 à une bactérie transformée pour l'un des marqueurs : les marqueurs sont donc très "liés", c'est à dire très proches l'un de l'autre sur la même molécule d'ADN, ce qu'on exprime par le "degré de liaison" élevé des 2 marqueurs : soit 90%. En effet la faible distance entre S et K empêche que S et K ne soient fréquemment séparés, par rupture ou par recombinaison entre les 2 marqueurs.

---

* Nous avons également constaté que lorsque l'expression phénotypique des caractères acquis par transformation est réalisée en milieu solide (voir Matériel et Méthodes), le nombre de bactéries transformées pour deux marqueurs s'avère être supérieur à celui obtenu par expression en milieu liquide; ces résultats n'ont pas reçus d'explication à l'heure actuelle.

S et N sont moins souvent transmis simultanément : leur degré de liaison, exprimé par rapport au taux de transformation du marqueur S est de 35%, et il est de 15,5% s'il est exprimé par rapport à N (tableau 2).

Le degré de liaison des marqueurs K et N apparaît, en comparaison, comme n'étant que de 18%, exprimé par rapport à K, et de 10% par rapport à N.

Il semble donc que la distance entre K et N soit plus grande que celle qui sépare S et N, N étant assez éloigné des marqueurs proches S et K. Ainsi les marqueurs se succèderaient sur la molécule d'ADN dans l'ordre : - K - S ———— N -

Sur ce point nos résultats sont en désaccord avec ceux de S.H.GOODGAL et R.M.HERRIOTT (R.M.HERRIOTT 1961) et de J.H. STUY (1961), qui sont en faveur d'une position intermédiaire de K, entre S et N; le degré de liaison entre K et S reste par contre le même, selon toutes les données expérimentales, quelle que soit la position relative des 2 marqueurs par rapport à N. Cette divergence des résultats pourrait être dûe :
- au marqueur K que nous avons étudié, qui pourrait ne pas être le même que le marqueur K de S.H.GOODGAL, utilisé également par J.H.STUY; le marqueur K que nous avons utilisé a été obtenu à partir du mutant K de la souche Rd isolé dans notre laboratoire (voir Matériel et Méthodes)

- à l'expression phénotypique du marqueur K. L'expression du marqueur K est, en effet, équivoque. Ce fait expérimental est signalé également par J.H.STUY (1961): la reproductibilité des expériences incluant le marqueur K seul, est inférieure à celle des expériences dans lesquelles sont utilisées les autres marqueurs.

Pour cette raison, dans les expériences où nous avons étudié les effets des différents traitements de l'ADN sur des marqueurs éloignés de l'Hémophile, nous avons utilisé exclusivement les marqueurs S et N.

Les degrés de liaisons de différents marqueurs varient selon les préparations d'ADN. Ils sont liés, en particulier, et surtout pour des marqueurs éloignés, à la taille des molécules d'une préparation d'ADN (J.H.STUY, thèse 1961; K.I.BERNS et C.A.THOMAS Jr., 1965; M.R.CHEVALLIER, communication personnelle)

Les valeurs de ces degrés de liaison ne sont donc pas des valeurs absolues ou définies à l'intérieur de faibles marges d'erreur mais n'ont pour objectif que de préciser le système de transformation étudié.

Quoiqu'il en soit de la position de K par rapport à S, en regard de N, le système transformant de H.influenzae a pu être défini comme suit, tant sur la base de nos résultats (tableau 1,2 et 3), que de ceux de S.H.GOODGAL et R.M.HERRIOTT et de J.H.STUY :

1) les marqueurs de résistance à la streptomycine, à la kanamycine et à la novobiocine : S, K et N sont portés par une même molécule d'ADN.

2) La distance qui sépare S et K sur la molécule d'ADN est plus petite que les distances S et N, ou K et N.

3) S, K et N sont certainement des marqueurs de tailles différentes : S K N, en rapport inverse avec leur taux de transfert au cours de transformation, le marqueur le plus petit ayant le plus de chance d'être intégré complètement et sous forme active.

Toutes les cinétiques d'inactivation confirment cette interprétation : S est plus sensible que K aux agents inactivants, lui-même plus sensible que N. (Une dégradation préférentielle d'un marqueur, en fonction de la nature ou de la séquence de ses bases, par exemple, semble peu vraisemblable).

4) Tous les autres marqueurs de l'Hémophile, connus à l'heure actuelle sont portés dans les préparations habituelles d'ADN ($M_w$=8 à 15.$10^6$) par des molécules différentes; la fréquence de

transformation simultanée pour deux de ces marqueurs est de l'ordre de $10^{-2}$ par rapport à celle de l'un des deux marqueurs.

Ce système de transformation présente donc un grand intérêt: il permet d'étudier les conséquences d'un même traitement d'ADN sur des régions plus ou moins étendues d'une même molécule d'ADN, incluant, en dehors des marqueurs eux-mêmes, les régions polynucléotidiques qui les séparent.

Notre travail porte sur l'induction de marqueurs, sur l'inactivation des marqueurs liés, sur la possibilité de séparer les marqueurs liés.

Dans ce but différents agents : mutagènes, inactivants et dépolymérisants de l'ADN, ont été essayés. Les effets de leur action sur l'ADN ont été mis en évidence par la comparaison du nombre de lésions qu'ils introduisent dans les différentes régions du segment d'ADN que nous venons de décrire, qui porte les 3 marqueurs liés.

## METHODES EXPERIMENTALES

## EXPLOITATION DES DONNEES EXPERIMENTALES

### I. LA TRANSFORMATION DE H. INFLUENZAE

#### Matériel

#### SOUCHES BACTERIENNES

Elles dérivent toutes de Hemophilus Influenzae Rd :petit bacille de l'ordre de 1 µ de long, gram négatif, non encapsulé (R = rough, désigne la nature rugueuse des colonies qu'il forme) et non pathogène; il est obtenu à partir de bactéries Sd "smooth", encapsulées et pathogènes, de type antigénétique d.

Dans ce travail nous avons utilisé la souche sauvage et des souches résistantes à divers antibiotiques. Nous les avons nommées :

Bactéries Rd : souche "sauvage" que nous devons à l'obligeance de P.SCHAEFFER;elle provient du laboratoire de H.E.ALEXANDER et G.LEIDY (Columbia University, N.Y.). - Cette souche transformable ne résiste à aucun des antibiotiques cités ci-après(voir sous antibiotiques) aux concentrations où ceux-ci ont été utilisés.

Bactéries Rd S :cette souche résiste à plus de 1 mg de streptomycine par ml de milieu de culture; le marqueur S est celui qui est utilisé par J.H.STUY(1961)sous la dénomination Sd.

Bactéries Rd K : elles sont résistantes à 8 µg de kanamycine par ml de milieu de culture grâce au marqueur K qui pourrait être similaire du marqueur $Ka_1$ isolé par S.H.GOODGAL (R.M. HERRIOTT,1961) et utilisé par S.H.STUY (Thèse 1961).

Bactéries Rd N : résistantes à 5 µg de novobiocine par ml de milieu de culture : le marqueur N semble être le marqueur C ou Ca utilisés par S.H.GOODGAL et R.M.HERRIOTT(1961) et par J.H.STUY (Thèse 1961).(Novobiocine = Cathomycine).

Ces trois souches de bactéries ont été obtenues dans ce laboratoire par isolement d'un mutant spontané de souche Rd, ayant acquis la résistance à l'antibiotique considéré.

Bactéries Rd E : résistantes à plus de 14 µg/ml d'érythromycine par ml de milieu de culture; 28 ug/ml ont un effet lethal important.

Bactéries Rd V : résistantes à plus de 240 µg de viomycine par ml de milieu de culture.

Ces deux souches bactériennes ont été obtenues par transformation de bactéries Rd par des ADN portant le marqueur de résistance correspondant; ceux-ci nous ont été aimablement fournis par R.M.HERRIOTT et S.H.GOODGAL(The John Hopkin's University).

Bactéries Rd SKN : cette souche, portant les trois marqueurs liés sous leur forme résistante, a été obtenue par transformation, par de l'ADN N, d'un mutant K de la souche S. - De ces bactéries ont été extraites les différentes préparations d'ADN SKN utilisées dans ce travail.

MILIEUX DE CULTURE

Les Hémophiles se caractérisent par leurs exigences nutritionnelles correspondant à leurs faibles capacités cataboliques; la culture des bactéries du genre Hemophilus nécessite des milieux riches et contenant obligatoirement, en dehors des sources habituelles de carbone et d'oxygène, de l'hémine et le coenzyme A ou DPN sous forme oxydé (diphosphopyridine nucléotide).

L'hémine a été introduite dans nos milieux par la présence, dans les milieux de culture de base utilisés, de sang de mouton défibriné. Tous les milieux de culture ont été additionnés de 5 µg de DPN, au moment de leur emploi.

a) Milieux de base

Tous ces milieux sont stérilisés à l'autoclave (20 minutes à 1 atmosphère).

- Milieu Levinthal Stock : L.S.

| | | |
|---|---|---|
| Brain Heart Infusion Difco | 35 g ‰ | 9/10e |
| Sang de mouton défibriné | | 1/10e |

On ajoute le sang (100 ml) à une solution de Brain Heart (35g/250 ml eau bidistillée) portée à 100°. Après quelques bouillons on filtre. On ajoute 750 ml d'eau bidistillée.

- Milieu Eugon

Eugon Broth Difco 30g ‰ eau bidistillée, porté à 100°.

- Milieu gélosé : gélose - tryptone.

On dissout bactotryptone 20 g dans 100 ml d'eau
ClNa 5 g distillée à chaud.
Beef extract 6 g

On ajoute 2,5g de gélose (=Bacto-Agar Difco) à 100 ml de milieu réparti en bouteilles (la gélose ne se répartissant pas d'une manière homogène, elle est ajoutée dans chaque bouteille).

b) Milieux utilisés

A tous ces milieux on ajoute, au moment de leur emploi, 5 µg de DPN par ml

- Milieu L.E.

Milieu Levinthal-Eugon = 1 partie Milieu L.S.
3 parties " Eugon
Milieu de culture liquide

- Milieu L.G.

Milieu Levinthal-Gélose = 1 partie Milieu L.S.
1 partie " Gélosé
Milieu de culture solide

Ce milieu, au moment de son utilisation, est coulé à la température de 50° dans des boîtes de Petri, et séché ensuite à 37° pendant 30 minutes (dans les boîtes ouvertes).

- Milieu L.E.G.

Milieu Levinthal-Eugon-Gélose = 1 partie Milieu L.S.
1 partie Milieu Eugon
1 partie Milieu Gélosé.

Ce milieu est utilisé, additionné d'antibiotiques, pour sélectionner les bactéries transformées, après expression en milieu solide; à cet effet il est coulé dans les boîtes de Petri à la température de 50°.

ANTIBIOTIQUES

En vue de sélectionner les bactéries selon leurs caractères de résistance, acquis par mutation ou par transformation, on ajoute aux milieux de culture un ou plusieurs de ces antibiotiques aux concentrations suivantes :

| Antibiotiques | Provenance | Forme Commerciale | Conc. en antibiotique (base) |
|---|---|---|---|
| Streptomycine | Sté Industrielle pour la fabrication des antibiotiques | Sulfate | 25 µg/ml |
| Kanamycine | Laboratoire Bristol Syracuse | | 4 à 6µg/ml |
| Cathomycine | Theraplix | | 1 à 4µg/ml |
| Erythromycine | | | 7 µg/ml |
| Viomycine | Vionactane Ciba,Bâle | Sulfate | 120 µg/ml |

Ces doses sont inférieures aux concentrations maxima auxquelles les bactéries sont susceptibles de résister; elles sont suffisantes pour empêcher la croissance des bactéries sensibles.

Parmi les bactéries sensibles, certaines, à la suite de mutations spontanées, deviennent également résistantes aux doses d'antibiotiques utilisées. Elles constituent le "background" ou nombre de bactéries résistantes à un antibiotique donné à l'intérieur d'une culture de bactéries sensibles: ce nombre, qui peut différer selon les cultures, est de l'ordre de :

en présence de streptomycine 25µg/ml: 0 - 3 (10) bactéries/$10^8$ bactéries sensibles

Kanamycine 4-6 µg/ml : 10-100(1000) bactéries

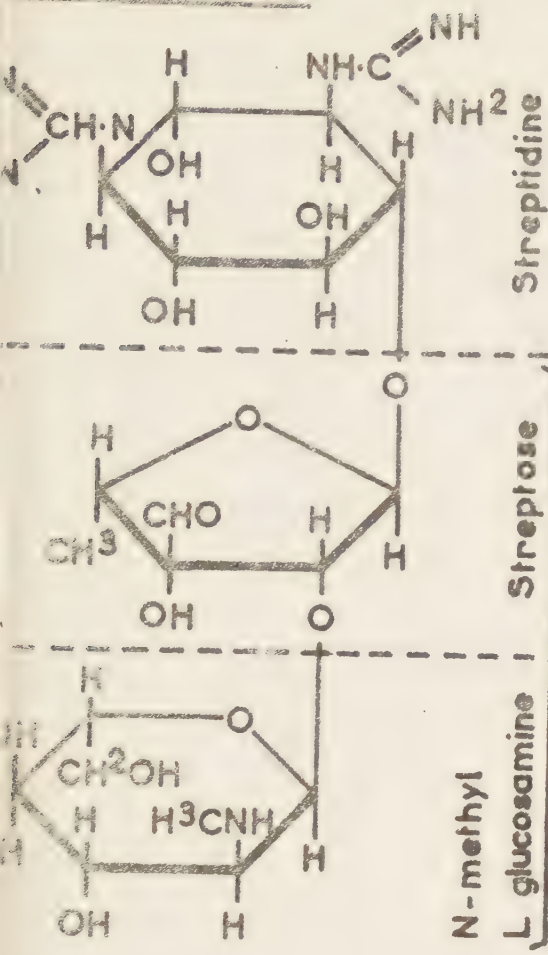
Novobiocine 1-4 µg/ml : 0 - 1 "

Erythromycine 7µg/ml : 0-10(50) "

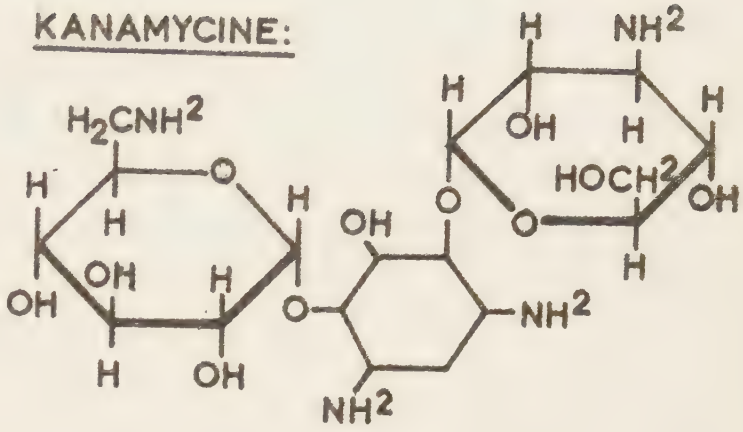
Viomycine 120µg/ml : 40-150 "

Des résistances spontanées doubles sont extrêmement rares.

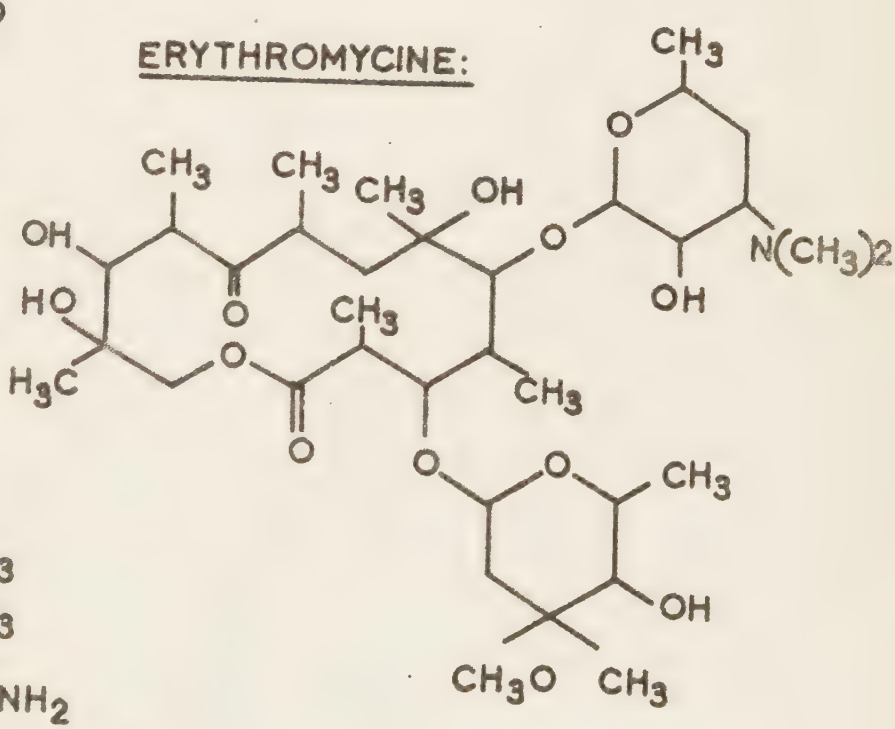
STREPTOMYCINE:



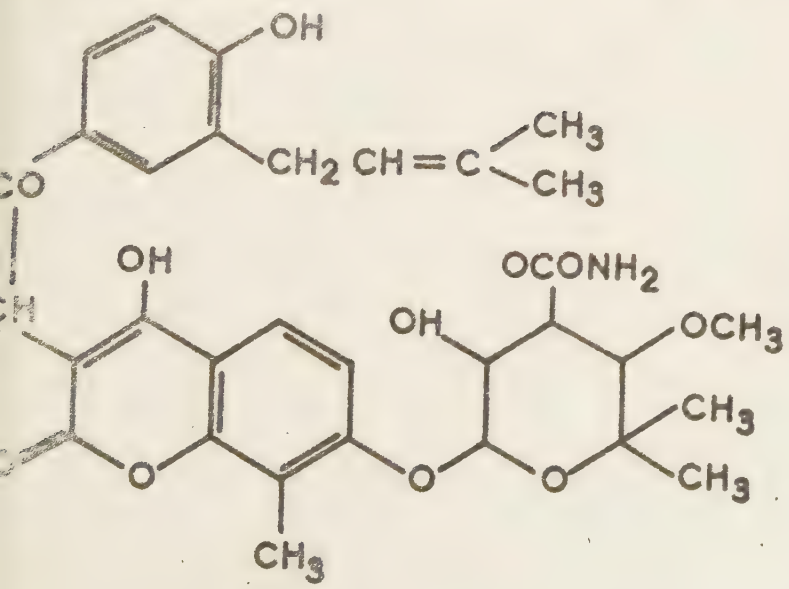

KANAMYCINE:



ERYTHROMYCINE:



NOVOBIOCINE:



VIOMYCINE:

Polypeptide très basique de constitution inconnue

ADN TRANSFORMANTS

Les ADN transformants ont été préparés à partir des souches bactériennes énumérées plus haut, selon la technique décrite dans "Méthodes". Les principales préparations d'ADN utilisées dans ce travail sont les suivantes :

| Préparations d'ADN | extraites de bactéries | par | utilisées dans l'étude de l'action sur l'ADN de |
|---|---|---|---|
| SKN 960 (Q) | Rd SKN | D.LUZZATI | Acide persuccinique |
| N 762 (28) | Rd N | et M.L.GRETH | |
| N 661 (U) | Rd N | " | |
| S 561 (T) | Rd S | " | |
| SKN 564 | Rd SKN | M.L.BACH | Ultra-sons et DNases |
| SKN 1063 | Rd SKN | " | |
| N 366 | Rd N | M.R.CHEVALLIER | |
| E 465 | Rd S | et B.WERLE | |

Les préparations d'ADN qui ont été soumises à l'action des agents dépolymérisants (Ultra-sons et DNAses) ont été caractérisées comme suit :

| Préparation d'ADN | (a) $T_m$ | Hyperchromicité à 100° | (b) | (b) $S^o_{20,w}$ | (b) $M_n$ | (b) $M_s$ | (b) $M_{DL}$ | (c) Protéines résiduelles | (d) UV Dische |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| DNA SKN 564 | 87,8 | 40 % | 6.031* 6.330* | 25 | $11,5.10^6$ $12,3.10^6$ | $12.10^6$ | $8,3.10^6$ | 1,01% | 19 |
| DNA SKN 1063 | | | | | | | $15.10^6$ | | 20,3 |
| DNA N 366 (N2/A) (N2/B) | 88 | 47 % | 6,613 | 25,9 22,19 | $13.10^6$ | $13.10^6$ $8,9.10^6$ | $10.10^6$ | 1,5% 0,83% | 21 |
| DNA E 465 | | | | | | | $14.10^6$ | 6,2% | 32,4 |

* 6.031 (pH5 0,15 M) 6.330 (pH6,7 0,01M)

a) Les points de fusion des échantillons d'ADN ont été mesurés à l'aide d'un spectrophotomètre UV "LERES" adapté par J.POUYET à l'étude des courbes de fusion.
b) Les techniques et formules utilisées, qui nous ont servi à déterminer ces différentes valeurs, sont décrites dans la 3ème partie de ce chapitre.
c) Dosage selon la technique décrite par L.K.RAMACHANDRAN et FRAENKEL-CONRAT(1958). Le résidu protéique est donné en %, en poids, de l'ADN.
d) Test colorimétrique de Dische (ZAMENHOF 1957) et absorption UV à 260 mμ. Ce rapport détermine la pureté de l'échantillon d'ADN (voir dans "Méthodes" : préparation d'ADN transformant).

## METHODES

La technique de transformation consiste en une mise en contact, en milieu liquide, d'ADN homologue ou très proche avec des bactéries aptes à absorber l'ADN exogène.

L'état particulier dit "de compétence" requis des bactéries est obtenu dans des conditions particulières de culture qui varient avec chaque espèce bactérienne et ne sont précisées qu'empiriquement; elles sont ainsi sujettes à modifications dans la mesure où l'expérimentation permet leur amélioration et nous avons utilisé successivement les conditions expérimentales déjà décrites (M.L.BACH, D.LUZZATI et R.M.CHEVALLIER,1966) et les modifications proposées ultérieurement par J.CAMERON (B.J.BARNHART et R.M.HERRIOTT 1963). S.H.GOODGAL et R.M.HERRIOTT (1961) puis H.T.SPENCER et R.M.HERRIOTT (1965) ont étudié les relations entre développement de la compétence et conditions de culture chez H.influenzae.

La préparation de l'ADN transformant se fait également selon des techniques particulières, adaptées au matériel utilisé. Nous décrirons le mode d'extraction et du purification de l'ADN transformant d'Hémophile que nous avons utilisé pour l'obtention de nos ADN, selon un procédé du type de celui décrit par J.MARMUR (1961).

PREPARATION DE L'ADN TRANSFORMANT D'HEMOPHILE

Cette préparation présente 3 étapes importantes :
- la culture des bactéries dont on extraira l'ADN
- la lyse des bactéries et l'extraction de l'ADN
- la purification de l'ADN.

L'ADN obtenu devra alors être conservé dans des conditions permettant de garder un matériel identique à lui-même pendant des temps assez longs.

Culture des Bactéries

Les bactéries sont cultivées avec bonne aération (en Erlens, contenant 1/10e de leur volume de milieu de culture, placés sur agitateur rotatif) en milieu LE additionné de l'antibiotique ou des antibiotiques auxquels les bactéries sont résistantes.

On les recueille en fin de phase exponentielle de croissance, par centrifugation dans une centrifugeuse Sharpless refroidie (vitesse de rotation = 27.000 tours/minute).

Lyse des bactéries

Le culot bactérien est resuspendu en solution ClNa 0,15 M Citrate trisodique 0,01 M : 20 cc pour 500 unités de D.O. de la culture, lue à 650 mμ; il est homogénéisé, puis lysé par addition de désoxycholate de Na (concentration finale=0,2 %) à pH 11 (par addition de NaOH). Lorsque la lyse est terminée (solution très visqueuse) on neutralise immédiatement par ClH.

Extraction de l'ADN

Elle est effectuée, ainsi que la purification ultérieure de l'ADN, en chambre froide à + 4°

On ajoute au lysat bactérien du ClNa (concentration finale 2 molaire) qui précipite l'ADN en proportions importantes, on agite 30 minutes avec 1/3 en volume de mélange chloroforme-alcool-isoamylique 9/1 (Sevag) pour dénaturer les protéines, puis on centrifuge (Centrifugeuse Spinco, 20 minutes à 15.000 tours/secondes). Le surnageant = $S_1$ de centrifugation contient l'ADN non purifié.

On extrait le culot bactérien par un nouveau Sevag. Après centrifugation on ajoute le surnageant à $S_1$.

Purification de l'ADN

Elle est réalisée par précipitation de l'ADN puis traitements par Sevag de l'ADN redissout, successifs, jusqu'à obtention d'un ADN présentant les caractères de pureté requis, donnés par :

- son absorption de rayonnements U.V. de $\lambda$ = 230 mμ
  260 mμ
  280 mμ .

Le rapport d'absorption à $\frac{260\ m\mu}{230\ m\mu}$ doit être voisin de 2,3;

le rapport d'absorption à $\frac{280\ m\mu}{260\ m\mu}$ doit être sensiblement=0,56;

Les variations de ces rapports au cours des traitements indiquent l'élimination progressive de l'ARN du milieu.

- le test colorimétrique de Dische (ZAMENHOF 1957), spécifique du désoxyribose, qui permet l'estimation de la concentration en ADN du milieu (par comparaison avec un ADN de référence).

L'absorption ultra-violette à 260 mu étant de 21 par mg d'ADN, le rapport :

$$\frac{\text{D.O à 260 m}\mu}{\text{conc. en mg d'ADN donné par test de Dische}}$$ devra être=21

toute valeur supérieure impliquant la présence d'ARN, ou la dénaturation de l'ADN.

- Le dosage, selon le test de LAWRY (L.K.RAMACHANDRAN et FRAENKEL-CONRAT 1958), des quantités de protéines présentes dans le milieu que l'on élimine habituellement jusqu'à un taux de 1% en poids de l'ADN en solution.

Pour éliminer ARN et protéines de la préparation d'ADN :

1°) On précipite l'ADN contenu dans le surnageant $S_1$ en ajoutant à ce dernier lentement deux volumes d'alcool à 95° ; l'ADN est recueilli sous forme de longues fibres qu'on enroule autour d'une baguette de verre, alors que les polysaccharides et l'ARN forment un précipité floconneux.

L'ADN est redissout en solution ClNa 0,15 mol., tampon phosphate 0,01 mol. pH 7. Cette dissolution est accélérée par une agitation douce.

2°) on fait deux Sevags successifs suivis de centrifugation.

3°) on traite par la RNase (WORTHINGTON) à raison de 6 µg/ml de surnageant du dernier Sevag et on laisse en contact pendant 3 heures à 37°.

4°) on fait un quatrième Sevag, suivi de centrifugation et on précipite l'ADN contenu dans le surnageant.

5°) on estime l'état de pureté sur l'ADN redissout (Dische-UV).

6°) on fait subir alors à l'ADN des Sevags et précipitations à l'alcool successifs jusqu'à obtention d'un ADN pur.

Celui-ci est conservé sur chloroforme, à + 4° à la concentration de 1 mg/ml de solution ClNa 0,15 M tampon phosphate 0,01 M pH 7.

Il sera testé quant à sa capacité de transférer, à des bactéries réceptrices, les caractères de résistance aux antibiotiques qu'il porte; ce test sera fait en fonction de la

concentration en ADN dans le milieu, en vue d'établir les limites entre les concentrations non-saturante et saturante d'ADN.

PREPARATION DES BACTERIES COMPETENTES

Les bactéries sont cultivées en milieu L.E.. La culture a lieu à 37° avec une bonne aération de façon à ce que le temps de division des bactéries soit de 25 à 30 minutes. Lorsque la culture a atteint, au cours de sa phase exponentielle, environ 1 à 2 . $10^9$ bactéries par ml (détermination par turbidimétrie de la suspension bactérienne à 650 mμ dans un spectrophotomètre Coleman), on poursuit l'incubation sans agitation, pendant 90 minutes à 37°, de façon à ce que celle-ci ait lieu dans des conditions d'aérobiose réduite. On ajoute alors du glycérol: concentration finale 15%, et on congèle à - 72°, le plus rapidement possible, des fractions de 2 ml environ.

Cette technique de préparation a été modifiée au cours de notre travail selon les données de J.CAMERON (B.J.BARNHART et R.M.HERRIOTT 1963).

Les modifications apportées sont les suivantes :

- les bactéries ayant atteint en culture aérée, après 2 ou 3 divisions, la concentration de $1.10^9$ bactéries/ml sont mises en conditions d'aérobiose réduite, c'est à dire sans agitation à 37°, pendant 1 heure.

- on agite alors à nouveau le milieu de culture pendant 30 minutes. Les bactéries sont alors conservées comme précédemment à - 72°, après addition de 15% de glycérol.

Les bactéries compétentes ainsi préparées conservent leur compétence pendant des temps plus longs (quelques mois au lieu de 3 semaines) et ceci sans que la compétence ne diminue au cours du temps.

TRANSFORMATION

Elle consiste en une mise en contact d'ADN transformant homologue avec des bactéries compétentes, et en une sélection ultérieure des bactéries transformées lorsqu'elles auront intégré l'ADN exogène et seront aptes à exprimer les caractères ainsi nouvellement acquis.

Une expérience de transformation comprend par suite trois étapes :

- la transformation proprement dite,
- l'expression des caractères acquis,
- la sélection des bactéries transformées,

chaque étape pouvant être réalisée selon des modes opératoires présentant des variantes que nous décrirons brièvement.

1 - La transformation proprement dite

Sauf mention particulière 0,1 ml de culture de bactéries compétentes fraîchement dégelées (= environ $3 .10^8$ bactéries) ont été ajoutées à 0,9 ml de solution d'ADN en ClNa 0,1 M, tampon phosphate 0,01 M, pH 7 et maintenues ainsi en contact à 37° pendant 30 minutes, sans agitation.

Selon la quantité d'ADN transformant mise en présence, cette transformation a été réalisée :

- à saturation d'ADN (concentration:1 µg/ml dans le milieu de transformation)
- au-dessous de la saturation en ADN (concentration: 0,01 µg/ml dans le milieu de transformation)

L'absorption de l'ADN par les bactéries est arrêtée par dilution des bactéries en milieu nutritif ce qui permettra leur multiplication et l'expression des caractères acquis. L'addition, dans ce but, de DNase au milieu de transformation (30µg/de DNase, en solution dans $SO_4Mg$ $6.10^{-4}$M, par ml de milieu de transformation) n'a pas modifié les taux de transformation que nous avons obtenus; il n'en a donc pas été fait usage dans notre travail.

2 - L'expression phénotypique des caractères acquis

Elle a lieu en milieu de culture non aéré, à 37°. A cet effet les bactéries transformées sont maintenues dans ces conditions pendant 90 minutes à 2 heures.

Expression en milieu liquide

Nous avons opéré habituellement en milieu de culture liquide : milieu L.E., dans lequel les bactéries sont diluées au 1/10e, et maintenues sans agitation pendant 90 minutes.

Expression en milieu solide

L'expression en milieu de culture solide L.G. se fait par incubation pendant 2 heures à 37°, en boîte de Petri, d'un mélange de 0,1 ml de milieu de transformation (dilué si nécessaire de manière à ce qu'il contienne 100 à 200 bactéries transformées pour le caractère étudié) et de 10 ml de milieu L.G. porté à 50°.

Cette deuxième méthode rend compte du nombre exact de bactéries transformées, chacune d'entre elles donnant naissance à un seul clône.

3 - Sélection des bactéries transformées

- Après expression en milieu liquide les suspensions bactériennes sont refroidies à 0°, et on étale 0,1 ml d'une dilution appropriée, contenant 100 à 200 bactéries, sur 20 ml de milieu solide L.G. contenant le ou les antibiotiques sélecteurs.

- Après expression phénotypique en milieu solide les bactéries transformées seront sélectionnées par milieu L.E.G. (10 ml par boîte de Petri) contenant une concentration double d'antibiotique(s) sélecteur(s), que l'on coule sur les 10 ml de milieu d'expression.

Les bactéries transformées sont alors incubées à 37°, en contact avec le milieu sélecteur, et les colonies auxquelles elles donnent naissance sont dénombrées après 18h à 48 h.

## Résultats expérimentaux obtenus par transformation. Exploitation des données expérimentales

### 1 - Etude de l'activité transformante d'un ADN. Application à la détermination de l'effet inactivant d'un agent sur l'ADN.

Les bactéries transformées par un ADN porteur de marqueurs de résistance à des antibiotiques sont sélectionnées sur milieu contenant ces mêmes antibiotiques. Un dénombrement des colonies auxquelles ces bactéries donnent naissance, compte tenu des dilutions auxquelles elles ont été étalées sur le milieu sélectif, donnera directement le nombre absolu de bactéries transformées.

Le pouvoir transformant de l'ADN sera donné par le rapport du nombre de bactéries transformées, au nombre de bactéries viables présentes dans la suspension bactérienne testée, dénombrée sur milieu dépourvu d'antibiotique.

Ce test permet de mettre en évidence des altérations produites au niveau d'un ADN au cours de sa préparation, au cours de sa conservation, ou à la suite de l'action d'un agent inactivant, et dans ce dernier cas, de suivre l'évolution de ces alétrations en fonction du temps de traitement ou des conditions opératoires.

En particulier, l'action inactivante, sur l'ADN, des agents étudiés sera déterminée par le rapport du nombre de bactéries, transformées par l'ADN traité (par ces agents), au nombre de transformées obtenues, au cours de la même expérience, par une concentration identique d'ADN témoin, non traité.

La cinétique d'inactivation sera étudiée soit en fonction du temps de traitement, soit en fonction d'autres paramètres tel que la chute de masse corrélative, ou le nombre de lésions, subies par l'ADN.

L'effet inactivant d'un agent pourra être évalué selon la théorie des cibles - que représentent chaque marqueur ou groupe de marqueurs liés - et la distribution de Poisson.

La théorie de coup unique ne peut s'appliquer que lorsque la relation qui lie l'inactivation à la dose est exponentielle. Dans ce cas une seule lésion suffit à inactiver la cible considérée. La dose à 37% est alors la dose nécessaire (quantité d'éléments inactivants nécessaires) pour introduire, dans cette cible, une lésion léthale : en effet, selon la distribution de Poisson, lorsque les lésions sont introduites au hasard dans une population, leur nombre équivaut à une lésion par cible oonsidérée lorsque 63% des éléments étudiés sont inactivés, ce qui laisse donc 37 sur 100 de ces cibles intactes.

Dans ces conditions, plusieurs estimations pourront être faites. Lorsqu'elles sont appliquées à différentes cibles, situées sur une même molécule d'ADN (telles que les marqueurs S, K et N de l'Hémophile, et les groupes de marqueurs S-K et S-N), elles permettent d'élargir les interprétations des effets, sur l'ADN, de l'action des différents agents étudiés.

Ces estimations sont :

1º - Détermination de la dose nécessaire pour introduire une lésion léthale dans les différentes cibles.

Si la cinétique d'inactivation des marqueurs et groupes de marqueurs est exponentielle, lorsque ceux-ci présenteront une survie de 37%, une lésion léthale aura été introduite dans une cible de taille égale à la taille de ces marqueurs.

2º - Evaluation de la sensibilité des marqueurs à l'action inactivante des agents étudiés.

La sensibilité d'un marqueur peut être définie par la relation : $s = \frac{1}{t} \log \frac{Nt}{No}$ dans laquelle Nt et No représentent le nombre de bactéries transformées, pour le caractère que spécifie le marqueur considéré, par de l'ADN ayant subi les temps t et 0 de traitement par l'agent inactivant étudié.

33.

On peut comparer la sensibilité de différents marqueurs soit à un même temps t de traitement, soit à une même valeur du rapport $\frac{Nt}{No}$ (en particulier lorsque log $\frac{Nt}{No} \doteq 0,37$).

3° - Evaluation de la taille des marqueurs - Effet inactivant des lésions.

Si la nature des lésions, qu'un agent inactivant introduit dans un ADN de masse Mw, est connue, et si leur nombre peut être établi à chaque instant t d'une cinétique d'inactivation, on peut - évaluer la taille relative des différents marqueurs génétiques portés par l'ADN, telle qu'elle est définie par le système de dégradation utilisé ; cette taille sera celle de la région d'ADN qui a reçu une lésion de l'agent inactivant lorsque l'activité transformante résiduelle de chaque marqueur est de 37 %.

- comparer l'effet inactivant de lésions de nature différente, leur effet inactivant étant d'autant plus important que la taille de la cible touchée, c'est-à-dire des marqueurs ainsi définis, sera grande.

4° - Effet des lésions produites par les agents étudiés sur le système transformant de l'Hémophile ou groupe de cibles situées sur la même molécule d'ADN.

Trois possibilités sont offertes lorsqu'on compare les sensibilités de différents marqueurs liés aux sensibilités de groupes des mêmes marqueurs, à la suite d'un même traitement inactivant :

- La sensibilité de 2 marqueurs essayés simultanément est égale à la somme des sensibilités individuelles des mêmes marqueurs, essayés séparément. La diminution de la capacité de l'ADN de transférer simutlanément l'information génétique portée par les 2 marqueurs est alors due uniquement à des lésions de l'un ou de l'autre de ces marqueurs.

2 - La sensibilité d'un groupe de 2 marqueurs, testés simultanément, est inférieure à la somme des sensibilités des marqueurs testés isolément.

Dans ce cas, certaines lésions léthales touchent simultanément les 2 marqueurs considérés.

3 - La sensibilité globale de 2 marqueurs est supérieure à la somme de leurs sensibilités individuelles. Ceci met en évidence des lésions léthales situées dans la région d'ADN comprise entre les 2 marqueurs. Il n'y a plus transfert simultané, par la même molécule d'ADN, des informations génétiques portées par les 2 marqueurs.

Ces comparaisons permettent donc la mise en évidence d'effets dits de "chevauchement" (2-) ou de "déliaison" (3-) de marqueurs liés (D.LUZZATI et coll.,1961; J.H.STUY, 1961), dûs aux lésions introduites dans l'ADN par l'agent étudié. Ces comparaisons donnent par conséquent des renseignements, d'une part sur le mode d'action de cet agent (agent inactivant : lésions au niveau des bases, agent dépolymérisant), et d'autre part sur l'étendue des régions nucléotidiques qu'il inactive.

## 2 - Détection de mutations induites par action d'un agent sur de l'ADN.

Les mutations induites sur un ADN transformant sont mises en évidence par les modifications de caractères génétiques que manifestent les bactéries transformées par cet ADN, et qui sont consécutives à l'intégration, dans le génome bactérien, de segments d'ADN transformant contenant des marqueurs mutés.

Les mutations étudiées chez H.influenzae sont des mutations vers la résistance aux antibiotiques. Pour étudier l'effet mutagène d'un agent sur l'ADN d'Hémophile, on utilise par conséquent une préparation d'ADN ne portant qu'un marqueur de résistance à un seul antibiotique; la chute d'activité transformante de l'ADN pour ce caractère de résistance indique l'efficacité du

traitement, et permet de relier l'effet mutagène observé au nombre de marqueurs non inactivés par ce traitement.

L'effet mutagène est mis en évidence par l'acquisition de caractères de résistance à d'autres antibiotiques; les bactéries transformées par l'ADN traité sont mises à pousser sur des milieux contenant ces autres antibiotiques. Du nombre de bactéries résistantes, ainsi obtenues, on retranche le nombre de mutants spontanés déterminé en absence d'ADN transformant.

3 - Détermination du pouvoir compétitif d'un ADN

Le pouvoir compétitif d'un ADN réflète son aptitude à se fixer sur les sites récepteurs des bactéries compétentes (P.SCHAEFFER,1957).

Il est mis en évidence par l'inhibition qu'il provoque ainsi à la pénétration dans les bactéries d'un ADN transformant,présent dans le milieu,et dont il diminue par conséquent, l'activité transformante.

L'ADN dont on veut tester le pouvoir compétitif est ajouté à différentes concentrations, élevées et supérieures à la concentration saturante d'ADN, à de l'ADN transformant présent dans le mélange en quantité saturante, ne portant pas le ou les mêmes caractères génétiques.

On transforme des bactéries compétentes par ces mélanges des deux ADN et on étale les bactéries transformées sur milieu contenant l'antibiotique auquel l'ADN transformant confère la résistance.

La présence d'ADN compétitif dans le milieu de transformation diminuera le nombre de bactéries transformées et cette diminution sera fonction de son pouvoir compétitif et de sa concentration. Le pouvoir compétitif de l'ADN sera donné par le rapport du nombre de bactéries transformées en absence et en présence d'ADN compétitif.

Ces expériences sont basées sur le travail de P.SCHAEFFER (Thèse 1961) dans lequel il analyse le pouvoir compétitif de divers ADN d'Hémophiles.

## II. ETUDE DES PROPRIETES PHYSIQUES DES ADN TRANSFORMANTS.

### MESURES DE VISCOSITE

La dépolymérisation de l'ADN d'Hémophile, au cours des traitements enzymatiques a été suivie par viscosité. Les données expérimentales ont été obtenues et traitées comme suit :

#### Mesures viscosimétriques

Elles ont été faites dans un viscosimètre à 4 boules de type J.EIGNER (1960) plongé dans un bain d'eau thermostaté à 28° ± 0,01. Ce viscosimètre permet de mesurer les viscosités en fonction du gradient , qui est différent dans chaque boule, et d'extrapoler ensuite les valeurs lues à gradient nul.

Les solvants utilisés sont ceux des milieux réactionnels des traitements enzymatiques, dans lesquels ont été dissous DNA et DNase.

L'ADN dans ces solvants était dilué à la concentration de 50 µg/ml.

Au cours des cinétiques de dégradation enzymatique la chute de viscosité de l'ADN a été suivie par mesure du temps d'écoulement de la solution dans une seule boule du viscosimètre, dans laquelle la solution était soumise à un gradient d'environ 75 $sec^{-1}$.

Cependant, pour chaque solvant utilisé, nous avons étudié l'influence du gradient sur la viscosité relative de l'ADN, avant et à chaque stade de sa dégradation enzymatique. Les gra-

dients de vitesse dans les quatre boules ont été calculés selon la formule de H.KROEPELIN (1929); ils se situent entre 90 et 20 $sec^{-1}$. Les lectures de viscosité relative dans les 4 boules nous ont permi de corriger celles-ci à gradient nul; nous avons ainsi pu déterminer les corrections à faire aux viscosités lues, au cours des dégradations, à un gradient de 75 $sec^{-1}$. Les facteurs de corrections que nous avons appliqués à tous nos résultats expérimentaux varient peu dans la zone de chute de viscosité étudiée. A titre d'exemple :

| ils varient entre | pour des échantillons d'ADN | | traités par | jusqu'à une chute de $\eta sp$. |
|---|---|---|---|---|
| 1,21 et 1,15 | en solution | 0.15M pH 5 | DNase acide pH 5 | =33,5 % |
| 1,19 et 1,13 | " | 0.01M pH 6,7 | DNase acide pH 6,7 | =16 % |
| 1,21 et 1,19 | " | 0.10M pH 6,8 | DNase pancréatique | =13 % |

Les valeurs de viscosité : $\frac{\eta sp}{c}$ , corrigées à gradient nul, ont ensuite été corrigées également à concentration nulle selon J.EIGNER (1960); dans la formule que nous avons appliquée :

$$[\eta] = \frac{\eta sp}{c} - \left[ \left( \frac{\eta sp}{c} \right)^2 . K' . C \right]$$

K' ou constante d'Huggins, est égal à 0,5 pour l'ADN natif, et C, la concentration de la solution en ADN, est exprimé en g/ml.

Calcul de la masse Mw de l'ADN à partir des valeurs de viscosité

C'est à partir de leur viscosité corrigée à gradient et à concentration nuls, = viscosité intrinsèque : $[\eta]$ , que nous avons calculé la masse moyenne en poids des échantillons d'ADN prélevés avant et au cours des traitements enzymatiques; nous avons utilisé la relation de J.EIGNER et P.DOTY (1965), valable pour les ADN de masse supérieure à 2 millions.

$$[\eta] = 6,9 \times 10^{-4} M^{0,70}$$

MESURES DE DIFFUSION DE LUMIERE

Des mesures de diffusion de lumière ont été faites en vue de déterminer la masse d'échantillons d'ADN dégradé par ultrasons (R.Litzler,1967).

Elles ont été effectuées par R.Litzler, à l'aide d'un photogoniodiffusomètre de G.WIPPLER et G.SCHEIBLING (1954).

Les mesures ont été faites à une seule concentration en ADN (50 ug/ml).

B.H.ZIMM (1948) a montré que l'expression générale de la lumière diffusée par un polymère polydisperse se met sous une forme qui fait intervenir la masse moyenne en poids du polymère en solution.

La masse moyenne en poids de l'ADN : $\overline{M}_w$, calculée selon cette relation, est toutefois entachée d'erreur pour des échantillons d'ADN de masse supérieure à $6.10^6$ daltons : D.FROELICH et coll.(1963); pour les échantillons de haute masse moléculaire les valeurs sont sous-estimées.

MESURES DE SEDIMENTATION

Des mesures de sédimentation ont été faites (R.Litzler 1967) sur les échantillons d'ADN dégradé par ultrasons.

Elles ont été effectuées à l'aide d'une ultracentrifugeuse Spinco, équipée d'une optique UV. Les vitesses de rotation étaient de 44.770 tours/minute et 50.740 tours/minute. L'ADN analysé était en solution dans ClNa 0,18M, citrate trisodique 0,02 M à la concentration de 20ug/ml.

L'expérience consiste à prendre une série de clichés en fonction du temps de centrifugation; ces clichés sont ana-

lysés au moyen d'un microdensitomètre Joyce qui traduit directement les intensités d'absorption en répartition des concentrations d'ADN dans toute la cellule de centrifugation.

L'ensemble de clichés de sédimentation permet de déterminer la constante de sédimentation, qui est donnée par la relation :

$$S_w^{20} = \log \frac{X_i}{X_o} \cdot \frac{2,3}{\omega^2} \frac{K_\theta}{t''}$$

dans laquelle les paramètres ont leur signification habituelle; $K_\theta$ désignant un coefficient qui tient compte de l'écart aux conditions standards : eau pure, 20°C (L.F.CAVALIERI et B.H.ROSENBERG,1961)

Calcul de la masse $\bar{M}_w$ des ADN d'après leur constante de sédimentation.

Nous avons à cet effet utilisé les relations données par J.EIGNER et P.DOTY (1965) :

(1) $S^\circ_{20,w} = 0,116\ M^{0,325}$

(2) $S^\circ_{20,w} = 0,034\ M^{0,405}$

L'expression (1) étant valable lorsque la masse de l'ADN est comprise entre $0,3.10^6$ et $4.10^6$, l'expression (2) étant appropriée lorsque l'ADN a une masse supérieure à $4.10^6$ daltons.

Exploitation des données expérimentales

Les mesures physiques effectuées sur les différentes préparations d'ADN transformant ont permis de caractériser les ADN utilisés dans ce travail.

Elles ont permis également de déterminer la masse des

échantillons d'ADN soumis à l'action dépolymérisante des ultrasons et des DNases.

De la chute de masse de l'ADN, au cours des traitements dépolymérisants, nous avons déduit :

- le nombre apparent de brins de l'ADN. La théorie de V.N.SCHUMACKER, E.G.RICHARDS et H.K.SCHACHMAN (1956) permet de déterminer le nombre de brins d'un polymère selon la cinétique de dégradation de celui-ci par un agent donné.

  Dans la formule :

$$\log \frac{1 - R}{R} = n \log t + \text{Constante}$$

  si R est égal à $M_t/M_o$ ou à $\eta_t/\eta_o$

  M étant la masse moyenne en poids du polymère; $\eta$ étant la viscosité spécifique du polymère en solution, au temps t et au temps o du traitement par l'agent considéré,

  n est le nombre de brins présenté par le substrat à l'égard de l'agent dépolymérisant (L.F.CAVALIERI et B.H.ROSENBERG,1961). Ce nombre nous a permis de caractériser l'action particulière de chaque préparation de DNase.

- le nombre de coupures opérées par molécule d'ADN au cours des traitements dépolymérisants.

  La chute de masse moyenne en poids $M_w$ lorsque celle-ci ne présente pas, au départ, une taille uniforme de molécules, est liée au nombre de ruptures par molécule selon la formule de A.CHARLESBY (1954) :

$$\frac{(M_w)_t}{(M_w)_o} = \frac{1}{1 + \frac{1}{p}}$$

A chaque temps t, cette formule permet de connaître le nombre p de ruptures qui ont lieu au hasard et en moyenne par molécule de masse $(M_w)_o$, et qui sont responsables de la chute de masse moyenne en poids de la préparation à la valeur $(M_w)_t$.
Ces valeurs ont été calculées et utilisées pour mettre en parallèle l'action dépolymérisante et l'action inactivante d'une part des différentes préparations enzymatiques et d'autre part des ultra-sons, sur l'ADN transformant d'Hémophile.

Lorsque l'ADN a été soumis à des ruptures d'un seul des deux brins de l'ADN ( par DNase pancréatique) nous avons estimé le nombre de ces ruptures en nous référant aux données de C.A.THOMAS (1956).

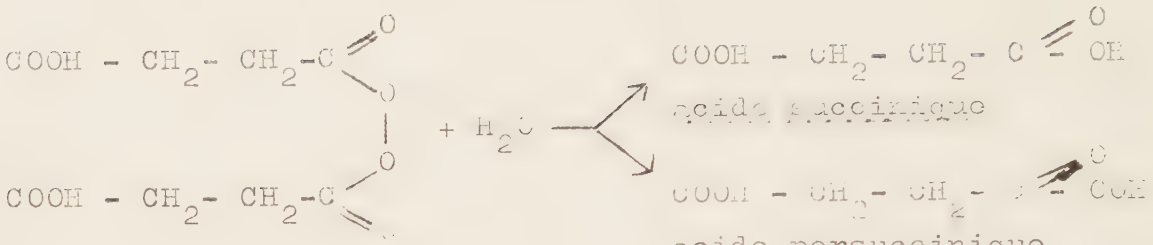
## III. ACTION DES DIFFERENTS AGENTS ETUDIES SUR L'ADN D'HEMOPHILE. CONDITIONS EXPERIMENTALES.

### TRAITEMENTS PAR L'ACIDE PERSUCCINIQUE

Nous avons fait agir l'acide persuccinique sur l'ADN d'Hémophile en ajoutant à une solution d'ADN, une solution extemporanée de peroxyde de disuccinoyle. Le peroxyde, en milieu aqueux, s'hydrolyse presque instantanément en acides succinique et persuccinique ; l'acide persuccinique agit donc ainsi à l'état naissant sur l'ADN.

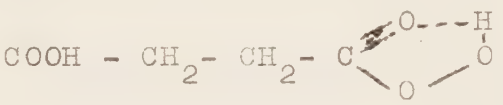
L'acide persuccinique peut, à son tour, donner de l'acide succinique et de l'oxygène (H.Schweitz,1967) ou, en réagissant sur l'eau, de l'eau oxygénée. Dans nos conditions expérimentales (pH , concentrations relatives peroxyde/ADN), les durées de traitements étant inférieures ou égales à 1 heure, l'acide persuccinique peut être considéré comme étant le seul composé réagissant sur l'ADN, et en particulier la formation d'eau oxygénée est négligeable; par ailleurs on peut admettre que la concentration en acide persuccinique ne varie pas au cours d'un traitement.

Schéma de décomposition du peroxyde de disuccinoyle



peroxyde de disuccinoyle

Le peracide succinique existe sous forme chélatée :



qui le rend particulièrement actif comme donneur d'oxygène.

Matériel :

| Préparations d'ADN | Etudes expérimentales dans lesquelles elles ont été utilisées |
|---|---|
| ADN SKN 960 (G) | Effet inactivant de l'acide persuccinique sur l'ADN natif. |
| ADN N 762 (28) | Effet inactivant de l'acide persuccinique sur l'ADN dénaturé. Formation de ponts covalents sur l'ADN par l'acide persuccinique. |
| ADN N 661 (U) | Effet mutagène de l'acide persuccinique sur l'ADN. |
| ADN S 561 (T) | Effet mutagène de l'acide persuccinique sur l'ADN. |
| Peroxyde de disuccinoyle | synthétisé par H. Schweitz (thèse 1967), selon la méthode de J. Blum (1959). Contient moins de 0,5 % d'eau oxygénée ; degré de pureté : 96-98 %. |

Conditions d'action.

2 mélanges réactionnels ont été utilisés, tenant compte des conditions de formation de l'eau oxygénée qui est plus lente à pH 7 qu'à pH plus bas (pH 4,3) ; à ce pH la décomposition de l'acide persuccinique étant par contre plus rapide, nous avons ajouté de grands excès de peroxyde dans le milieu :

| | ADN | Peracide | Solvant | Rapport $\frac{\text{Peroxyde}}{\text{ADN}}$ en poids |
|---|---|---|---|---|
| 1° | 25 µg/ml | 2 mg/ml | Tampon succinate Na, o,1M pH7 (NaOH) | 8o/1 |
| 2° | 25o µg/ml | 4 mg/ml | Tampon succinate o,2M pH7 (NaOH) | 16/1 |

Mode opératoire.

L'ADN, conservé en solution concentrée dans NaCl o,15 M pH 7 (tampon phosphate $10^{-2}$ M), est ajouté dans les proportions indiquées ci-dessus à une solution de peroxyde de disuccinoyle préparée au moment de l'emploi. Le mélange est plongé instantanément dans un bain-marie à 37°. Les prélèvements sont faits en fonction du temps de traitement et dilués immédiatement au 1/1o° dans le milieu L.E. maintenu à + 4°C.
L'ADN traité est conservé ainsi à + 4°. Il peut être utilisé directement dans les tests de transformation, après dilution adéquate.

Lorsqu'il est soumis à des traitements ultérieurs : dénaturation ou renaturation (lorsque l'ADN a été traité par le perchlorate sous forme dénaturée), il est dialysé au préalable contre une solution ClNa o,3 M Citrate o,o3 M.
Dénaturation thermique: lo minutes à loo°, refroidissement rapide à 0°
Renaturation thermique: 1 heure à 67°, suivie de refroidissement lent (dans un bain d'eau de 5 litres)

TRAITEMENTS PAR ULTRA-SONS

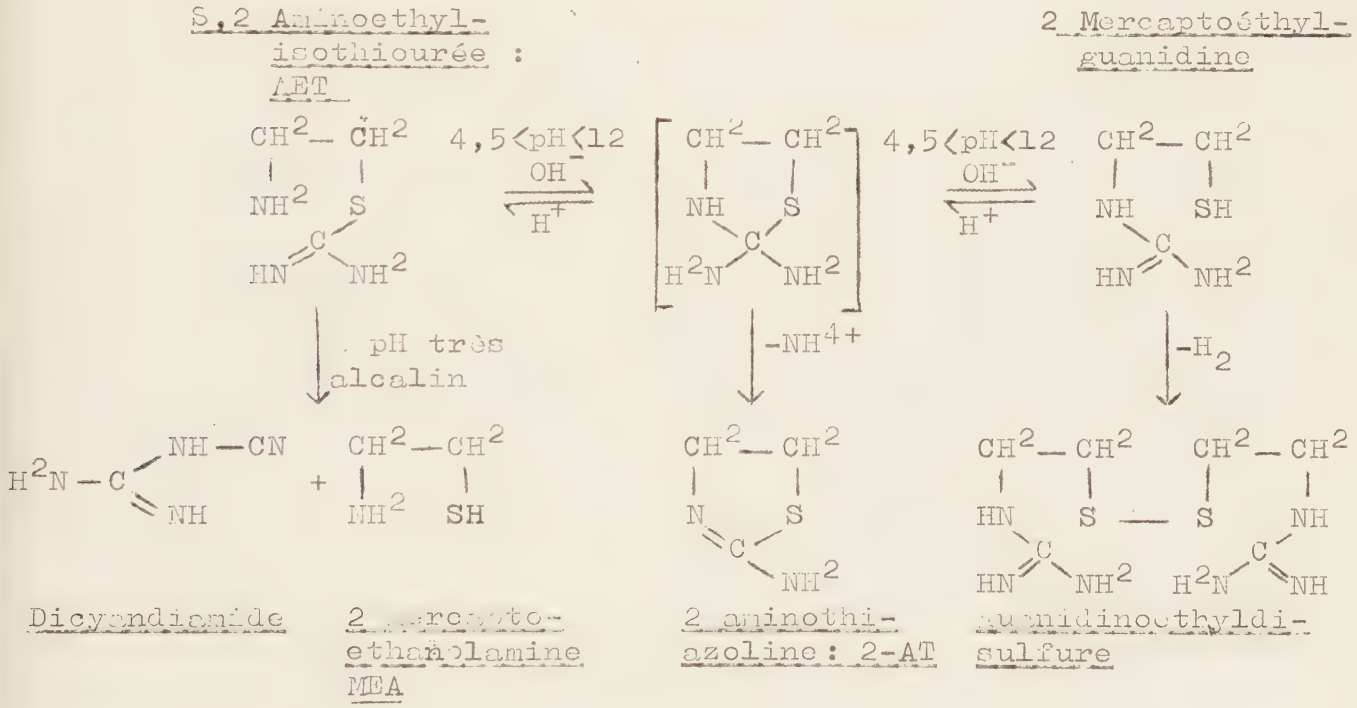
Les dégradations ultrasonores d'ADN ont été effectuées à l'aide d'un désintégrateur Mullard fonctionnant à la fréquence de 2o kc/s. Les solutions d'ADN ont été soumises à des durées différentes de sonolyse. Certaines dégradations ont été réalisées sur des solutions d'ADN contenant un protecteur contre les effets radiochimiques des ultra-sons: l'AET.
La masse des échantillons d'ADN dégradé a été déterminée par diffusion de lumière et/ou sédimentation.

Matériel

| Préparations d'ADN | Expériences dans lesquelles ils ont été utilisés |
|---|---|
| ADN SKN 564 | Dégradation de l'ADN par ultra-sons |
| ADN N 366 | Dégradation de l'ADN en présence d'AET |
| ADN E 465 | ADN de référence dans les tests de compétition. |

Préparation d'AET : abréviation de Amino-éthyl-isothiouronium (bromide) ou bromhydrate de bromo-2-aminoéthyl-isothiourée (forme commerciale).

Ce composé est actif comme protecteur radiochimique lorsqu'il est sous forme de 2 Mercapto-éthylguanidine (MEG): R.SMITHERA, D.W.DOLLERY, W.I.BURNETT (1957); dans ce cas deux molécules de MEG donnent une molécule de Guanido-éthyl-disulfide et liberent de l'hydrogène qui réagira sur les radicaux OH du milieu irradié.
La transformation de l'AET en MEG a lieu lorsque l'AET est dissous dans un milieu aqueux de pH supérieur à 4,5 ; elle est optimale à pH neutre (J.X. KHYM et coll. 1957).




L'effet protecteur de l'AET n'a pas été un phénomène expérimental reproductible (l'AET est susceptible de se décomposer sans donner du MEG, comme le montre le schéma ci-dessus). Les raisons n'en sont pas connues. Nous avons essayé divers lots d'AET :-AET "NBC" : Nutritional Biochemicals Corporation (Cleveland),

-AET "Sigma",

-plusieurs échantillons d'AET synthétisés au laboratoire par R. Rueff, selon la méthode décrite par R. SHAPIRA et coll. (1957).

Ultra-sons - Conditions opératoires.

La dégradation de l'ADN par ultra-sons a été réalisée dans un désintégrateur Mullard 3looo de puissance acoustique : 32,4 watts. La fréquence d'ondes des ultra-sons est de 2o kc/s.
L'ADN y est dégradé à raison de 5o µg/ml en solution ClNa o,18 M citrate trisodique o,o2 M

Mode opératoire.

5o ml de solution d'ADN sont introduits dans la cuve du désintégrateur et soumis pendant le temps choisi aux ondes ultrasonores (piston en titane).
Deux précautions sont à prendre pendant l'irradiation :

1° maintenir une puissance d'irradiation constante ; elle doit être surveillée pendant toute la durée des irradiations.

2° maintenir une température inférieure à 3o°C ; les solutions ont été irradiées dans une cuve refroidie et des vérifications ont montré que la température ne dépasse jamais 3o°C.

Les solutions d'ADN irradiées peuvent être conservées (généralement sur chloroforme), pendant des temps très longs, à 4°.

TRAITEMENTS PAR DNAses.

L'ADN transformant d'Hémophile a été soumis à des traitements par la DNAse acide à pH 5 et à pH 6,7, par la DNAse pancréatique et par la DNAse de Coli.

Le mode opératoire est similaire dans les trois cas, seules les conditions d'action et de son arrêt varient pour chaque traitement enzymatique.

La cinétique de dépolimérisation de l'ADN, à 28°, a été suivie par viscosimétrie.

Matériel : ADN et DNAses.

| Préparations d'ADN : | utilisées dans les études expérimentales suivantes : |
|---|---|
| ADN SKN 564 | Dégradation par DNAse acide et par DNAse pancréatique. |
| ADN N 366 (fraction $N_2/A$) | Dégradation par DNAse acide et par DNAse pancréatique, en vue de tester le pouvoir compétitif de l'ADN dégradé. |
| | Dégradation par DNAse de Coli. |
| ADN E 465 | ADN de référence dans les tests de compétition. |

DNAses :

1° DNAse acide : préparations HS 10, HS 13, HS 16 et HS 19 de G. BERNARDI.
Elles sont extraites de rate de porc selon la méthode de G. BERNARDI et M. GRIFFE (1964) modifiée par G. BERNARDI, A. BERNARDI et A. CHERSI (1966).
Les enzymes sont conservés en solution concentrée à 1,5 mg/ml en tampon acé-

tate o,1 M pH 5 et dilués au moment de leur emploi.

2° DNAse pancréatique : DNAse cristallisée (1x) WORTHINGTON : lot 932.

3° DNAse de Coli : (= endonucléase I de Lehman) préparée selon C. CORDONNIER et G. BERNARDI (1966).

L'enzyme est conservé en solution congelée à raison de o,o1 mg/ml de tampon tris. pH 7,6.

Conditions d'action

- de la DNAse acide à pH 5 :

Solvant utilisé :

- Tampon acétate o,15 M à pH 5
- Versène o,o1 M
- Cytochrome C de coeur de boeuf (Sigma type V) o,oo [illegible].

Concentration en DNAse :

légèrement différente selon les cinétiques recherchées, elle est de l'ordre de o,15 mg/ml dans le milieu réactionnel.

Arrêt de l'action de la DNAse :

- Tampon phosphate o,15 Molaire pH 6,8 1 volume
- Mélange 4/1 chloroforme-alcool isoamylique : 2 volumes

pour 1 volume de milieu réactionnel

Le pH et la force ionique du milieu sont

ainsi modifiés et inhibent l'action de l'enzyme ; le chloroforme dénature la protéine enzymatique

- de la DNAse acide à pH 7 :

Solvant utilisé :

Tampon phosphate o,o1 M pH 6,7

Concentration en DNAse :

La DNAse acide est utilisée à concentration supérieure lorsqu'on la fait agir à pH 7, la cinétique de dépolymérisation de l'ADN étant plus lente dans ces conditions. Sa concentration dans le milieu réactionnel est de l'ordre de 5,25 mγg de DNAse/ml, soit 35 fois plus élevée que lorsqu'elle est utilisée à pH 5.

Arrêt de l'action de la DNAse :

{ Solution NaCl Molaire : 1 volume
{ Mélange 4/1 Chloroforme-alcool isoamylique : 2 volumes

pour 1 volume de milieu réactionnel.

La solution saline remonte la force ionique du milieu et le chloroforme dénature la protéine enzymatique.

- de la DNAse pancréatique :

Solvant utilisé :

{ Tampon phosphate o,1 M pH 6,8
{ $MgCl^2$ o,o2 M

Concentration en DNAse :

La DNAse pancréatique a été utilisée à la concentration d'environ 1,5 mµg/ml dans le milieu réactionnel.

Arrêt de l'action de la DNAse :

- NaCl 1 M : 1 volume
- Mélange 4/1 chloroforme-alcool isoamylique : 2 volumes

pour un volume de milieu réactionnel.

- de la DNAse de Coli :

Solvant utilisé :

- Tris ( = Tri [hydroxyméthyl] amino-méthane) o,o66 M pH 7,6
- $MgCl_2$ o,oo6 M

Concentration en DNAse :

Elle est de l'ordre de o,12 mµg/ml.

Arrêt de l'action de la DNAse :

- NaCl M : 1 volume
- Mélange 4/1 chloroforme-alcool isoamylique : 2 volumes

pour 1 volume de milieu réactionnel.

Mode opératoire :

L'ADN, conservé en solution concentrée (o,5-1mg/ml) en ClNa o,15M pH7, est dialysé contre 3x2oo volumes de solvant utilisé pour la réaction enzymatique. Puis il est dilué à 5o µg/ml dans ce même solvant et centrifugé à 14.ooo

tours/minute pour dépoussiérer la solution.

La DNAse, en solution stock ou sous forme cristalline, est diluée une première fois, ou dissoute dans le même solvant. Le facteur de dilution tient compte de sa dilution ultérieure dans le milieu réactionnel; cette première dilution doit être aussi faible que possible, le système de dilution intervenant dans l'efficacité d'action de l'enzyme.

On mesure la viscosité de la solution d'ADN.

A 30 ml de cette solution, maintenue à 28° dans le bain-marie du viscosimètre, on ajoute environ 0,05 ml de la première dilution de DNAse. On réintroduit 20 ml du mélange obtenu dans le viscosimètre et l'on suit la cinétique de dégradation de l'ADN.

A intervalles réguliers, ou à des temps choisis en fonction de la chute de viscosité, on prélève un aliquote du mélange réactionnel restant, toujours maintenu à la même température dans un petit Erlen bouché plongeant dans le bain-marie du viscosimètre. Cet aliquote est mélangé immédiatement, et en agitant, à un volume adéquate du milieu d'arrêt de la réaction enzymatique conservé à la température de la glace fondante. Pour les tests de transformations des prélèvements de 1 ml étaient suffisants ; par contre l'utilisation de fortes concentrations en ADN dans les tests de compétition ont nécessité des prélevements plus importants : dans ce cas ils étaient de 3 ml, la quantité de milieu réactionnel de départ étant alors de 30ml.

Les mesures viscosimétriques ont été effectuées dans les conditions décrites dans le chapitre : Etude des propriétés physiques des ADN.

Les prélèvements effectués au cours des cinétiques ont été utilisés dans les tests d'activité biologique. A cet effet, l'ADN devait cependant être préalablement remis en milieu favorable à la transformation bactérienne, soit par sam-

ple dilution en solvant de force ionique et de pH adéquats en vue d'obtenir un milieu de transformation de pH7 et $\mu$ = 0,15, soit par dialyse lorsque les prélèvements étaient utilisés dans des tests de compétition.

## 1ère PARTIE

## ACTION DU PERACIDE SUCCINIQUE SUR L'ADN D'HEMOPHILE

≠ Introduction
≠ Action du peracide sur l'ADN natif
≠ Action du peracide sur l'ADN dénaturé
≠ Discussions et Conclusions

# INTRODUCTION

L'étude de l'action mutagène des peroxydes tient son origine dans les travaux de W.STONE, O.WYSS et F.HAAS qui observent (1946) des mutations chez Staphylococcus aureus lorsque ces bactéries sont cultivées dans un milieu préalablement soumis à des radiationsionisantes, et attribuent par la suite (mêmes auteurs : O.WYSS et coll., 1947 à 1950) ces mutations à la formation de peroxydes organiques dans le milieu de culture irradié.

Ces observations avaient un grand intérêt dans la mesure où elles suggéraient la possibilité que des peroxydes puissent agir comme intermédiaires dans l'action des radiations ionisantes; elles ont ainsi incité divers auteurs à de nouvelles recherches.

Dès 1949, F.H.DICKEY, S.H.CLELAND et C.LOTZ confirment l'effet mutagène de certains peroxydes organiques déterminés et de l'eau oxygénée sur Neurospora.

R.LATARJET (1956 et 1958) a étudié l'action inactivante de peroxydes organiques et de $H_2O_2$ sur des bactéries (différentes souches de E.coli), des phages (phage $\lambda$ et de la série T) et sur l'ADN purifié extrait de Diplococcus pneumoniae;parmi les peroxydes qui ont manifesté une action inactivante, l'un des plus actifs, tant "in vivo" que "in vitro" est le peroxyde succinique. De la comparaison des effets de cet agent avec ceux des rayons X sur l'ADN transformant du pneumocoque, l'auteur conclut que l'effet des rayons X pourrait être du à l'action de peroxydes dont ils induiraient la formation.

M.R.CHEVALLIER, reprenant l'étude de l'action du peroxyde succinique sur Escherichia Coli, a montré que E.coli B/r, qui est résistant aux radiations ionisantes, est également résistant au peroxyde succinique, et a mis en évidence une action mutagène spécifique du peroxyde sur E.coli B. (D.LUZZATI et M.R.CHEVALLIER, 1957; M.R.CHEVALLIER et D.LUZZATI, 1960). L'effet mutagène observé est interprété comme résultant de l'action du peroxyde sur l'ADN bactérien.

Cette interprétation est étayée par la corrélation observée par R.LATARJET (1956), entre la sensibilité des phages au peroxyde et leur teneur en ADN.

Cet ensemble de données nous a incité à choisir cet agent : le peroxyde succinique, ou acide persuccinique (SCHWEITZ, 1967), pour étudier son action sur l'ADN, en utilisant la technique de transformation. Celle-ci devait nous permettre de comparer l'effet du peroxyde sur les différents marqueurs liés de l'Hémophile et ainsi de déterminer l'étendue et la spécificité des lésions qu'il provoque sur l'ADN; les études menées parallèlement par H.SCHWEITZ sur les modifications chimiques de l'ADN au cours de sa peroxydation devaient nous permettre de préciser la nature de ces lésions. Si, par surcroît, certaines de ces lésions devaient s'avérer être mutagènes et le peroxyde succinique, par là, être un agent susceptible d'induire des mutations in vitro, la spécificité de ces mutations pouvait être comparée à celle des mutations observées in vivo par M.R.CHEVALLIER.

Le "peroxyde succinique", dont nous avons étudié l'action sur l'activité transformante d'un ADN, agit en réalité sur l'ADN sous forme d'acide persuccinique obtenu à l'état naissant par dissolution dans l'eau de disuccinoyle-peroxyde (voir méthodes expérimentales) : H.SCHWEITZ 1967. Il dégrade les bases

puriques et pyrimidiques de l'ADN ( D.LUZZATI et coll. 1961; H.SCHWEITZ, 1967); il se forme de l'hypoxanthine, de l'uracile et une autre base non identifiée. Lorsqu'il agit sur l'ADN, la sensibilité des bases à son action n'est pas très différente et croît dans l'ordre $T < C < A < G$ alors que la guanine est attaquée préférentiellement lorsqu'il agit sur les deoxyribonucleotides. Les étapes successives de dégradation des bases ne sont pas connues; en particulier les 1-N oxydes de l'adénine et de la cytosine, obtenus lors de traitement des nucléosides et des nucléotides de l'ADN par le peracide, (M.R.CHEVALLIER 1964; H.SCHWEITZ 1967), n'ont pu être mis en évidence lorsque ces bases sont engagées dans l'ADN. Ce dernier résultat concorde avec ceux de CRAMER et SEIDEL (1963 et 1964).

Le peracide ne détache pas les bases de l'ADN et ne détruit pas le désoxyribose; il ne dépolymérise pas l'ADN : à la suite de traitement prolongé (30 heures, concentration peroxyde/ ADN = 40), alors que 30% des bases de l'ADN sont dégradées, on ne constate qu'une faible chute de masse de l'ADN (de $6.10^6$ daltons à $2.10^6$ daltons p.ex.) dûe probablement à l'action de l'eau oxygénée qui se forme au cours d'incubations prolongées.

L'étude que nous avons entreprise concernant l'action de l'acide persuccinique sur l'ADN d'Hémophilus influenzae, a été faite dans des conditions où la formation d'eau oxygénée est négligeable, et où seules les bases de l'ADN sont dégradées. Nous avons examiné plusieurs points :

- Nous avons d'abord précisé les conditions et le mode de son action inactivante vis à vis de différents marqueurs de l'ADN d'Hémophile.

- Nous avons recherché une action mutagène du peracide sur l'ADN.

- L'action mutagène du peracide s'étant révélée être extrêmement

faible, nous avons examiné si, à part les modifications des bases de l'ADN, le peracide était susceptible de provoquer d'autres types de modifications de l'ADN, intéressant sa structure secondaire, et qui pourraient masquer les lésions mutagènes. Nous avons ainsi mis en évidence la formation de ponts covalents entre les deux brins de la double hélice d'ADN peroxydé.

# ACTION DE L'ACIDE PERSUCCINIQUE SUR L'ADN NATIF D'HEMOPHILE

## I. INACTIVATION DES MARQUEURS GENETIQUES. EFFET MUTAGENE

### 1) Inactivation des marqueurs de l'ADN

Nous avons étudié l'inactivation par le peracide succinique des 3 marqueurs génétiques liés de l'ADN d'Hémophile : S, K et N (marqueurs de résistance à la streptomycine, à la kanamycine, à la novobiocine).

Lorsqu'on porte l'activité transformante résiduelle de ces marqueurs en fonction de la durée du traitement, l'inactivation apparaît comme résultant d'une cinétique de 1er ordre (figures 1, 2 et 3) ; un seul évènement lésionnel serait donc responsable de la perte de pouvoir transformant de chacun des marqueurs étudiés.

Cependant ceux-ci présentent vis-à-vis de l'action du peracide succinique une sensiblité différente (graphiques 1, 2 et 3). Nous constatons que le marqueur N est nettement moins sensible à un même traitement que les deux autres marqueurs, le marqueur S étant le plus inactivé. Nous avons déterminé (voir chapitre · Matériel et Méthodes) et comparé la sensibilité des 3 marqueurs; si nous posons la sensibilité du marqueur N comme étant égale à 1, la sensibilité relative des marqueurs K et S sera respectivement égale à 1,6 et à 1,96.

Si chaque marqueur peut être inactivé par une seule lésion touchant la région d'ADN où il est situé, ces deux résultats suggèrent l'hypothèse d'une taille différente des 3 marqueurs, le marqueur N étant la séquence nucléotidique la plus courte, le marqueur S constituant au contraire vis-à-vis du peracide la cible la plus grande. J.H.STUY (Thèse 1961) et

Figures 1, 2 et 3

INACTIVATION DES MARQUEURS LIES DE H.INFLUENZAE
PAR L'ADIDE PERSUCCINIQUE

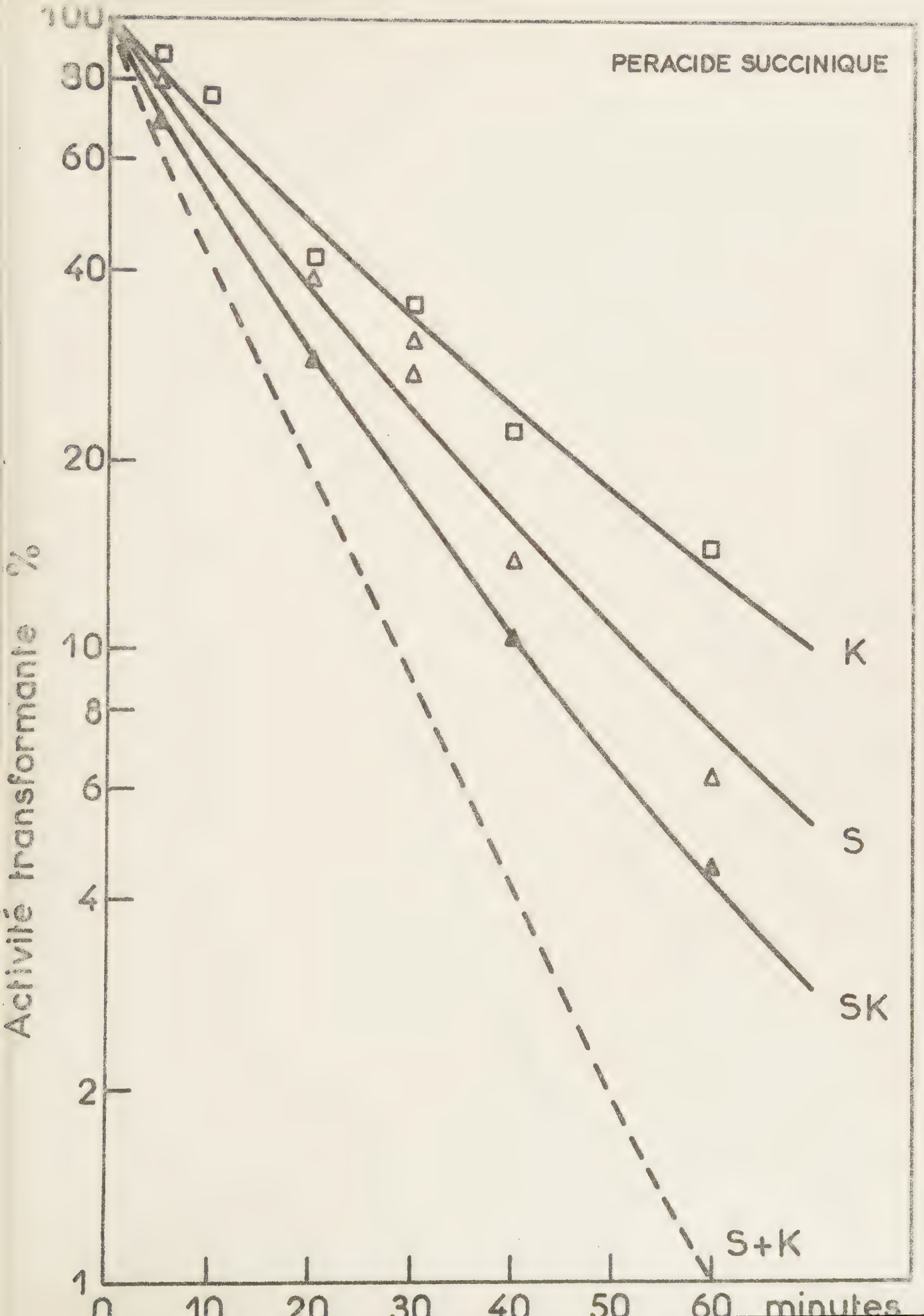
Milieu réactionnel : ADN Préparation SKN 96o(Q) : 25µg/ml
+ acide persuccinique 2mg/ml en tampon
succinate o,1M pH 7.

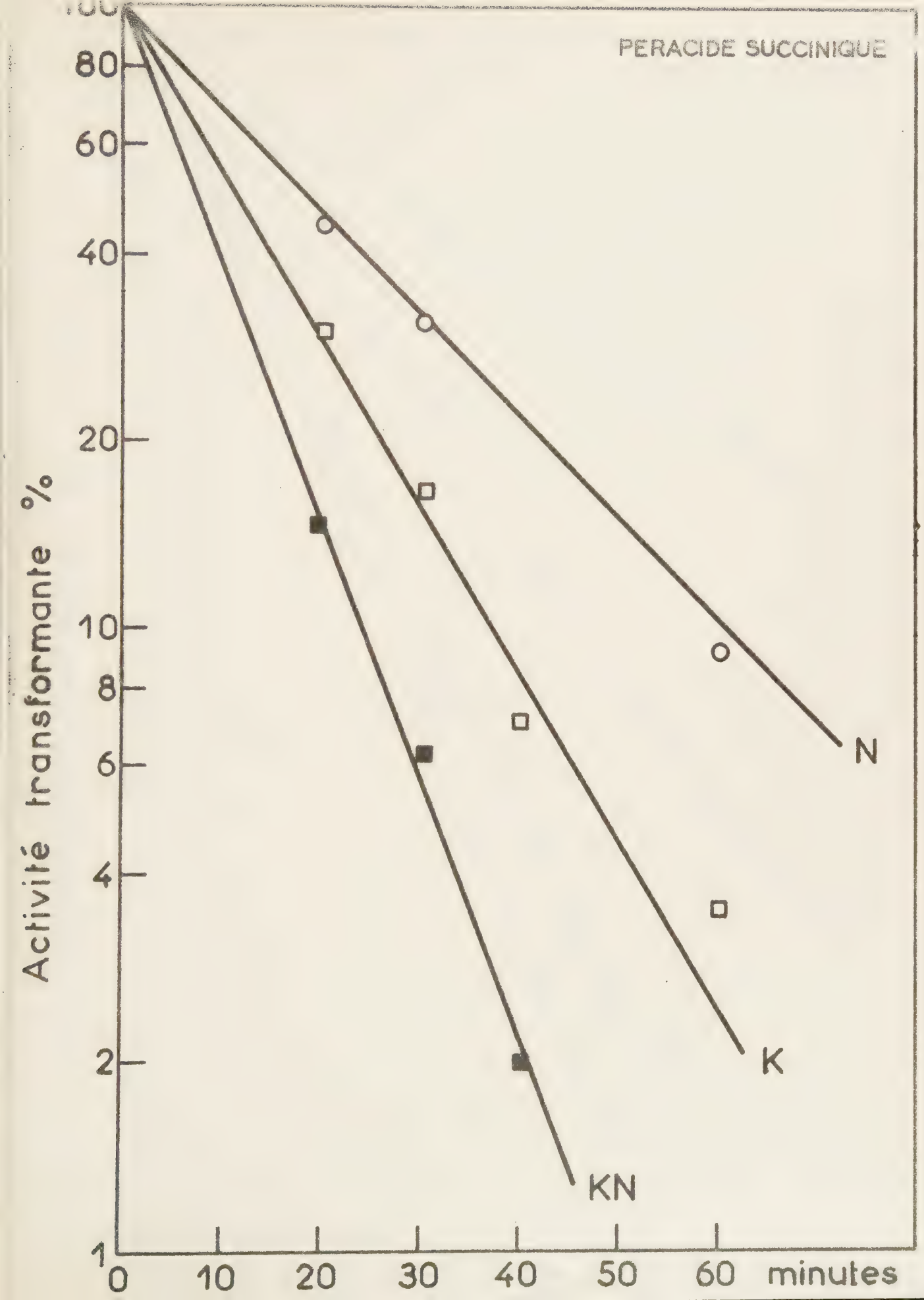
Figure 1 - Inactivation des marqueurs S et K et du groupe de marqueurs S-K(Effet de chevauchement). La courbe en pointillé indique l'inactivation globale des marqueurs S et K testés isolément.

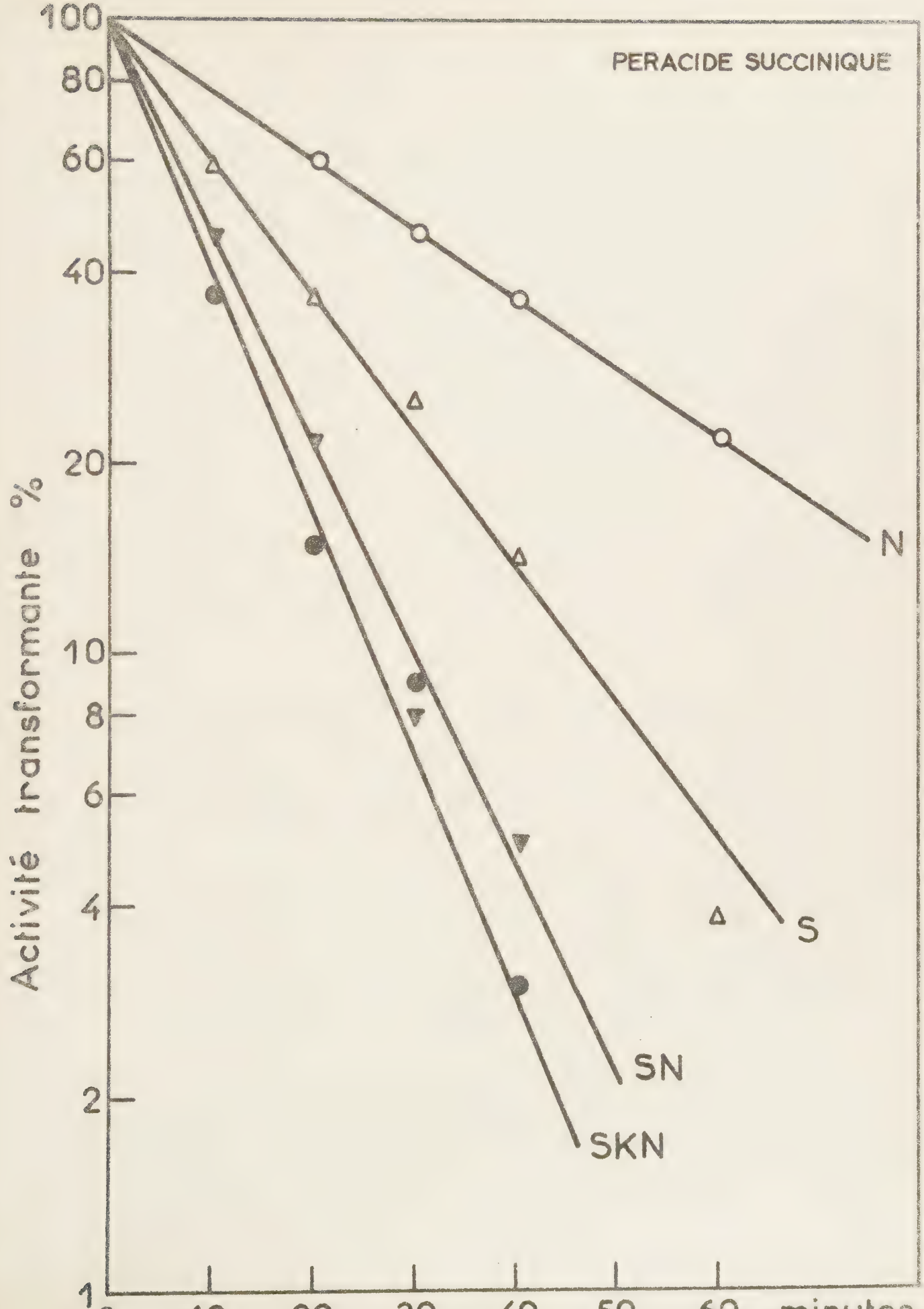
Figure 2 - Inactivation des marqueurs N et K et du groupe de marqueurs K-N(Additivité)

Figure 3 - Inactivation des marqueurs N et S et du groupe de marqueurs S-N.( Additivité) Inactivation simultanée des trois marqueurs liés.

L'activité transformante résiduelle des différents marqueurs, au cours des traitements par l'acide persuccinique, est donnée en % de leur activité dans l'ADN non traité.


PERACIDE SUCCINIQUE
100
30
60
40
20
10
8
6
4
2
1
Activité transformante %
K
S
SK
S+K
0
10
20
30
40
50
60 minutes


PERACIDE SUCCINIQUE
Activité transformante %
100
80
60
40
20
10
8
6
4
2
1
0
10
20
30
40
50
60
minutes
N
K
KN


PERACIDE SUCCINIQUE
Activité transformante %
100
80
60
40
20
10
8
6
4
2
1
N
S
SN
SKN
0
10
20
30
40
50
60
minutes

S.H.GOODGAL(1961) ont également observé des sensibilités différentes, et dans le même ordre, de ces mêmes marqueurs soumis à d'autres agents inactivants: chaleur, U.V., DNase pancréatique, radiations ionisantes, ultra-sons.

Dans la mesure où ces agents ont, sur l'ADN, un mécanisme d'action très différent, on peut admettre que les différences de sensibilités observées dépendent de différences dans la taille des marqueurs. Par ailleurs on sait que l'acide persuccinique qui dégrade les bases de l'ADN sans toucher à la chaîne phosphate-sucre qui les porte, ne manifeste pas de spécificité dans son action sur les bases.

Le marqueur S apparaît comme étant 2 fois plus sensible que le marqueur N au traitement de l'ADN par l'acide persuccinique; il aurait donc en regard de cet agent inactivant, une taille approximativement double de celle du marqueur N.

Nous avons également étudié la diminution, à la suite du traitement par le peracide succinique, de la transformation simultanée par 2 ou par les 3 marqueurs liés de l'ADN. Nous avons pu ainsi comparer la sensibilité d'un segment génétique étendu à la sensibilité des marqueurs testés qu'il englobe.

Les figures 1, 2 et 3 montrent que l'inactivation simultanée des marqueurs S et K, K et N, S et N, de même que des 3 marqueurs S, K et N, suit également une loi exponentielle; dans ces cas également une seule lésion serait responsable de la chute du pouvoir transformant de ces groupes de marqueurs.

Si l'on compare la sensibilité au traitement par l'acide persuccinique des transformations simultanées pour 2 marqueurs à la sensibilité des différents marqueurs étudiés isolément, on constate :

1° que la sensibilité de SK est inférieure à la somme des sensibilités des deux marqueurs testés séparément (celle-ci est donnée dans la figure 1 par la courbe en pointillé).

2° que KN et SN présentent une sensibilité égale à la somme des sensibilités des deux marqueurs qui en font partie.

Ces résultats nous permettent les conclusions suivantes :

1° On sait que les marqueurs S et K, portés par la même molécule d'ADN, sont transférés simultanément, par transformation, avec une très grande fréquence : 90 % des bactéries transformées pour l'un des 2 marqueurs acquièrent ainsi simultanément le 2ème marqueur. La région nucléotidique qui sépare S et K doit être donc relativement restreinte, ce qui évite leur déliaison au cours des phénomènes de transformation et intervient également dans les résultats d'inactivation de ce segment génétique.
L'écart observé dans la sensibilité du segment SK, par rapport à l'additivité des sensibilités des marqueurs S et K, peut être défini comme un "effet de chevauchement". Parmi les lésions produites par le peracide succinique, certaines inactivent soit le marqueur S, soit le marqueur K, alors que d'autres inactivent à la fois le marqueur S et le marqueur K, et sont par suite localisées exclusivement ou partiellement dans la région nucléotidique qui les sépare. Ces lésions ont donc un effet qui s'étend à un segment au moins égal ou supérieur à celui qui sépare les 2 marqueurs S et K.

Nous avons calculé la fréquence des lésions inactivant à la fois S et K, en appliquant la loi de Poisson aux résultats de la figure 1.
Lorsque l'inactivation globale de S et de K (courbe SK) apparait comme étant dûe à une lésion, on observe 0,815 lésions par marqueur S (courbe S) et 0,635 lésions par marqueur K (courbe K), soit au total 1,45 lésions (courbe S + K). Par conséquent 45 % des lésions responsables de l'inactivation des marqueurs S et K inactivent simultanément les 2 marqueurs.

2° La sensibilité des transformations simultanées S-N et K-N, par contre, est égale à la somme des sensibilités des marqueurs respectifs S et N ou K et N. Chaque lésion touchant l'un des marqueurs considérés contribue à l'empêchement de la transformation conjointe par les 2 marqueurs. La distance qui les sépare sur la molécule d'ADN doit donc être supérieure à celle qui sépare S et K. Le degré de liaison entre ces marqueurs apparait en effet comme étant égal à 55 % pour SN rapporté au marqueur S et à 28 % pour KN rapporté au marqueur K, alors qu'il est de 90 % pour les marqueurs S et K (voir chapitre 1).

3° Les traitements par le peracide ne diminuent pas le degré de liaison entre les marqueurs. Ceci se traduirait par une sensibilité des marqueurs, testés simultanément, supérieure à la somme des sensibilités des marqueurs essayés séparément et pourrait être consécutif à des scissions de la chaîne polynucléotidique de l'ADN par le peracide succinique. Ce résultat

étaye les données de H. SCHWEITZ qui indiquent que très peu de ruptures de la chaîne de l'ADN se produisent lors de traitement par le peracide.

L'étude de l'inactivation de l'ADN d'Hémophile par le peracide succinique a ainsi mis en évidence :

1° une dégradation exponentielle des marqueurs étudiés S, K et N ,

2° par des lésions qui inhibent, au cours de la transformation, l'intégration d'un segment nucléotidique de l'ADN au moins égal à la distance qui sépare les 2 marqueurs génétiques S et K ;

3° sans qu'apparaisse, par déliaison de marqueurs, une action dépolymérisante du peracide vis-à-vis de l'ADN.

Elle apporte des données supplémentaires en faveur d'une taille différente des marqueurs étudiés, attribuant, comme les travaux expérimentaux de J.H. STUY (thèse 1961), le plus petit segment génétique au marqueur de résistance à la novobiocine et le plus grand segment au marqueur S.

2) Recherche de mutants induits par action du peracide sur l'ADN.

Nous avons espéré induire des mutations vers des caractères de résistance à divers antibiotiques : S (streptomycine), K (kanamycine), N (novobiocine), E (erytromycine),

V (viomycine) en traitant in vitro, par le peracide succinique, de l'ADN porteur des marqueurs génétiques correspondants sous leur forme sauvage, c'est-à-dire de sensibilité vis-à-vis de ces mêmes antibiotiques.

L'ADN utilisé dans ce but portait soit le marqueur N, soit le marqueur S (forme résistante), dont l'inactivation, suivie parallèlement à la recherche de mutations, a permis de déterminer l'intensité du traitement de l'ADN par le peracide.

Un premier résultat positif, obtenu dès 1960 dans ce même laboratoire par [illegible] lors d'expériences préliminaires, et traduisant une augmentation d'un facteur 16 du nombre de mutants de résistance à la kanamycine (tableau I Exp.1), nous a incité à multiplier les expériences dans cette voie malgré des résultats assez peu encourageants; les mutants décomptés s'avéraient soit ne pas être significativement en nombre supérieur au nombre de mutants spontanés observés pour chaque caractère étudié, ou d'autre part leur accroissement ne paraissait pas, dans une même expérience, être en relation directe avec l'intensité du traitement inducteur. De plus l'augmentation du nombre de mutants, même en nombre restreint, n'a pas été un phénomène constant au cours de nos expériences. Nous conclurons à des résultats négatifs en ce qui concerne l'induction de résistance à la streptomycine et à l'erythromycine. Seulement pour le caractère de résistance à la viomycine nous avons pu observer un accroissement significatif du nombre de bactéries transformées par des marqueurs"néoformés" : l'expérience 2 du tableau I donne le meilleur résultat obtenu.

Tableau I

Action de l'acide persuccinique sur l'ADN natif d'Hemophile : Effet mutagène

| | Temps de traitement (minutes) | Inactivation (marqueur S) 25µg/ml | Effet mutagène Bactéries résistantes par boîte ($2,5.10^7$ bactéries), à K 4µg/ml | E 5µg/ml | V 120µg/ml |
|---|---|---|---|---|---|
| Exp. 1 | 0 | 100 | 10 | | |
| | 2 | 67 | 137 | | |
| | 5 | 56 | 190 | | |
| | 10 | 31 | 240 | | |
| Exp. 2 | 0 | 100 | | | 5,1 |
| | 5 | 61,5 | | | 6,4 |
| | 10 | 52,5 | | | 6,4 |
| | 20 | 46 | | | 9,2 |
| | 30 | 33,5 | | | 16,4 |
| | 40 | 28 | | | 17,8 |
| Exp. 3 | 0 | 100 | 245 | 0,8 | 44 |
| | 5 | 96,5 | 227 | 0,8 | 61 |
| | 10 | 61,5 | 274 | 0,2 | 53 |
| | 20 | 56 | 140 | 0,8 | 58 |
| | 30 | 21 | 156 | 1,2 | 53 |

Milieu réactionnel: ADN (S 561) : 25µg/ml + acide persuccinique 2mg/ml, en tampon succinate de sodium 0,1M pH 7 (NaOH)

Les valeurs données dans ce tableau ne sont pas corrigées pour tenir compte de l'inactivation simultanée des marqueurs étudiés (R.M.LITMAN 1961). Si on effectue cette correction on peut estimer à 45, au lieu de 17,8 , dans l'expérience 2

le nombre maximum de bactéries transformées, par boîte, par des marqueurs viomycine-résistants néoformés.

Différentes explications pouvaient rendre compte de ces résultats:

l'effet mutagène de l'acide persuccinique, observé in vivo, serait en partie le résultat d'un mécanisme faisant intervenir des r actions qui n'ont pas lieu in vitro;

les bases des marqueurs étudiés ne subiraient qu'à une très basse fréquence une action spécifique de l'acide persuccinique donnant lieu aux mutations recherchées;

l'acide persuccinique déterminerait sur l'ADN des lésions empêchant la détection des mutations induites.

Nous avons essayé de vérifier la troisième hypothèse en recherchant si, au cours du traitement par le peracide succinique, il y a formation de pontages covalents entre les deux brins de l'ADN natif d'Hemophile.
Cette recherche a été entreprise à la suite de résultats obtenus lors de traitement du même ADN par l'acide nitreux, résultats qui sont en faveur d'une corrélation entre l'absence d'effet mutagène de $NO_2H$ vis-à-vis de l'ADN natif, et la formation, entre les constituants des deux brins de l'ADN, de telles liaisons covalentes.

L'acide nitreux, dans son action vis-à-vis de l'ADN d'Hemophile, s'était révélé être un agent inactivant, sans action mutagène (J.H. STUY 1961; E.E.HORN et R.D.HERRIOT 1962; D.LUZZATI 1962). Il a pu être montré que l'acide nitreux induit la formation de liaisons covalentes entre les deux brins de la double hélice d'ADN ( E.P.GEIDUSCHECK 1961) et qu'un traitement, par cet agent, d'ADN d'Hemophile dans des conditions où ces pontages n'ont pas lieu (ADN dénaturé), permet la mise en évidence ultérieure (après renaturation de

l'ADN) de mutations induites.(D.LUZZATI 1962, E.E.HORN et R.M.HERRIOT 1962).

Nous avons donc dans la suite de notre travail recherché si le peracide succinique induit également la formation de ponts covalents entre les deux brins de l'ADN d'Hémophile et s'il manifeste une action mutagène sur l'ADN dénaturé.

## II.FORMATION DE PONTS COVALENTS ENTRE LES DEUX BRINS DE L'ADN

La formation de liaisons covalentes entre les deux hélices d'ADN, au cours des traitements par le peracide succinique, a été mise en évidence par l'étude de la dénaturation et de la renaturation thermique d'ADN peroxydé. Selon E.P.GEIDUSCHEK (1962), de tels pontages empêchent la dénaturation irréversible de l'ADN.

Nous avons observé un empêchement croissant à la dénaturation thermique de l'ADN, en fonction de la durée du traitement par le peracide : tableau II.
La diminution du pouvoir transformant de l'ADN (marqueur N), consécutive à sa dénaturation, est moins importante lorsque l'ADN a été, au préalable, soumis à l'action du peracide; l'ADN peroxydé peut alors conserver, après dénaturation, jusqu'à 58% de son activité transformante, tandis que l'ADN témoin ne conserve que 4% de son activité initiale (colonne 4).

Tableau I.

Effet d'un traitement par l'acide persuccinique sur la dénaturation de l'ADN d'Hemophile.

| Temps de traitement. (minutes) | ADN (marqueur N) natif | | Après dénaturation | |
|---|---|---|---|---|
| | Bactéries transformées /ml (1) | Activité transformante % (2) | Bactéries transformées /ml (3) | Activité restante (col.3/col.1) x100 (4) |
| 0 | $1,4.10^5$ | 100 | $5,8.10^3$ | 4,1 |
| 5 | $1 .10^4$ | 71,5 | $6,4.10^3$ | 6,4 |
| 10 | $8,5.10^4$ | 60,5 | $7,2.10^3$ | 8,5 |
| 20 | $4 .10^4$ | 28,6 | $7,4.10^3$ | 18,5 |
| 30 | $1,9.10^3$ | 13,6 | $4,6.10^3$ | 24,2 |
| 40 | $6,2.10^3$ | 4,4 | $3,6.10^2$ | 58 |
| 60 | $8,4.10^2$ | 0,6 | $4,7.10^2$ | 56 |

Traitement par l'acide persuccinique : ADN (N661) 250µg/ml + Acide persuccinique 4mg/ml en tampon succinate de sodium 0,2 M pH 7 (NaOH).

Ce résultat a été étayé par des mesures d'absorption optique de l'ADN, qui reflètent l'état global des molécules, à différents temps de l'action de l'acide persuccinique. La dénaturation et la renaturation thermiques ultérieures de l'ADN ont été ainsi analysées (tableau III).

L'augmentation de cette absorption, après chauffage de l'ADN au-dessus de son point de fusion, traduit l'irréversibilité de sa dénaturation; elle s'est révélée être bien moindre pour l'ADN traité par le peracide succinique que pour l'ADN témoin. La valeur faible de l'effet hyperchromique des molécules d'ADN, au cours de ces expériences, est en accord avec l'activité transformante résiduelle élevée, corrélative,

du marqueur N, et confirme l'empêchement à la dénaturation d'ADN peroxydé.

Tableau I.f

Absorption à 26omu et activité transformante d'ADN d'Hemophile traité par l'acide persuccinique puis dénaturé et renaturé.

| Temps de traitement (minutes) | | D.O. | Effet hyperchromique | Bactéries transformées/ml | Activité transformante (marqueur N) % de 1. |
|---|---|---|---|---|---|
| 0 | 1.ADN natif | o,618* | | $2,1.1o^4$ | |
| | 2.Après dénat. | o,721 | 16,7 | $5,4.1o^2$ | 2,6 |
| | 3.Après renat. | o,69o | 11,7 | $9,6.1o^3$ | 45,5 |
| 4o | 1.ADN natif | o,544* | | $6,3.1o^3$ | |
| | 2.Après dénat. | o,616 | 13 | $1,8.1o^3$ | 27 |
| | 3.Après renat. | o,592 | 8,8 | $3,9.1o^3$ | 5o |
| 6o | 1.ADN natif | o,555* | | $4,7.1o^3$ | |
| | 2.Après dénat. | o,583 | 9 | $1,8.1o^3$ | 38,5 |
| | 3.Après renat. | o,552 | 3,2 | $2,7.1o^3$ | 57,5 |

Traitement d'ADN (28) 762 par l'acide persuccinique : mêmes conditions que tableau II.

Effet hyperchromique: après dénat.=(D.O.2 - D.O.1)x1oo/D.O.1
après renat.=(D.O.3 - D.O.1)x1oo/D.O.1

* Les différences de D.O. des échantillons natifs dépendent de variations de concentration de l'ADN dues à la dialyse.

Certaines altérations produites par le peracide succini-

que sur les molécules d'ADN ont donc pour effet de restreindre la désorganisation de sa structure secondaire, consécutive à la dénaturation d'un ADN natif. Ces effets sont ceux que l'on attend de la formation de ponts covalents entre les constituants des deux brins de la double hélice d'ADN natif (GELDUSCHEK 1962).

# ACTION DE L'ACIDE PERSUCCINIQUE SUR L'ADN DENATURE D'HEMOPHILE

## I. [illegible] MUTAGENE

La recherche de mutations induites par l'acide persuccinique sur l'ADN, par traitement de celui-ci à l'état dénaturé, a été faite sur la même préparation d'ADN et selon les mêmes méthodes que celles décrites dans le chapitre ayant trait à la recherche de mutants induits par traitement d'ADN natif. Conformément aux techniques de E.E.HORN et RM. HERRIOTT (1962) et de D.LUZZATI (1962), l'ADN a été traité après dénaturation thermique - 10 minutes à 100°, puis refroidissement brusque à 0°-, ensuite dialysé pour enlever l'excès de peracide, et renaturé par chauffage à 67° pendant une heure.
Les mêmes mutations, conférant à l'ADN la résistance aux antibiotiques déjà cités : streptomycine, kanamycine, erythromycine, viomycine, ont été étudiées.

On n'observe pas, en utilisant de l'ADN ainsi traité, une augmentation significative du nombre de bactéries transformées par des marqueurs néoformés, par rapport à celui obtenu, dans la même expérience, en utilisant de l'ADN traité par le peracide à l'état natif.

Ce résultat diffère donc de ceux obtenus, en particulier par D.LUZZATI (1962), après traitement d'ADN d'Hemophile, à l'état dénaturé, par l'acide nitreux; dans ce cas on observe une augmentation importante des mutations de ces mêmes marqueurs génétiques vers leur forme résistante.

Cependant, au cours de ces expériences, nous avons simultanément analysé l'activité transformante de l'ADN (marqueur N) et la répercussion, sur cette activité, des traitements successifs auxquels l'ADN a été soumis : nous avons constaté que l'ADN traité à l'état dénaturé par l'acide persuccinique ne se renature plus (voir paragraphe suivant). Ceci peut expliquer pourquoi l'ADN dénaturé n'est pas un substrat plus favorable que l'ADN natif à la mise en évidence d'une action mutagène du peracide succinique sur l'ADN in vitro.

## II INACTIVATION DES MARQUEURS - RENATURATION ULTERIEURE DE L'ADN

Nous avons, en étudiant l'inactivation de l'ADN dénaturé d'Hemophile par le peracide, constaté (tableau IV), que le pouvoir transformant résiduel de l'ADN dénaturé n'est pas de beaucoup plus sensible que celui de l'ADN natif, à l'action inactivante du peracide succinique.

Tableau IV

Effet inactivant de l'action de l'acide persuccinique sur le pouvoir transformant de l'ADN d'Hemophile natif et dénaturé.

| Temps de traitement (minutes) | ADN natif | | ADN dénaturé | |
|---|---|---|---|---|
| | Bactéries transformées/ml | Inactivation | Bactéries transformées/ml | Inactivation |
| 0 | $8,0.10^4$ | 100 | $1,1.10^4$ | 100 |
| 5 | $5,9.10^4$ | 73,8 | $8,3.10^3$ | 75,5 |
| 10 | $5,7.10^4$ | 70,5 | $5,2.10^3$ | 47,3 |
| 15 | $6,0.10^4$ | 75 | $4,5.10^3$ | 41 |
| 20 | $4,8.10^4$ | 60 | $3,5.10^3$ | 31,8 |

Dénaturation : ADN (28)762 : 500ug/ml en ClNa 0,15M pH7

Traitement par l'acide persuccinique : ADN 250 ug/ml + acide persuccinique 4 mg/ml en tampon succinate de sodium 0,2M pH 7 (NaOH)

Ces résultats ont reçu leur explication ultérieurement : étant donné que l'activité transformante résiduelle de l'ADN d'Hemophile dénaturé par la chaleur est l'apanage de molécules qui ne sont pas complètement dénaturées (H.BUC 1965 - M.R.CHEVALLIER et G.BERNARDI 1965) il n'est pas étonnant de constater que les effets inactivants du peracide succinique soient du même ordre de grandeur sur l'ADN natif et sur l'ADN dénaturé, ni que le nombre de mutants de résistance aux antibiotiques, apparaissant après traitement par le peracide succinique, soit le même quelles que soient les conditions opératoires : traitement d'ADN natif ou traitement d'ADN dénaturé. Cependant il était étonnant que le nombre de mutants n'augmente pas après renaturation de l'ADN traité à l'état dénaturé.

Or les résultats expérimentaux (tableau V) montrent que le traitement, par le peracide succinique, d'ADN d'Hemo-

phile dénaturé entrave la renaturation ultérieure de l'ADN, et ceci même après des temps très courts d'action du peracide.

Tableau V

Action de l'acide persuccinique sur l'ADN préalablement dénaturé. Effet sur le renaturabilité de l'ADN

| Temps de traitement (minutes) | ADN dénaturé | Après dénaturation | |
|---|---|---|---|
| | Bactéries transformées /ml (1) | Bactéries transformées /ml (2) | Renaturation (2/1) |
| 0 | $7,6.10^3$ (x) | $6,2.10^4$ (xx) | 8,2 |
| 5 | $5,9.10^3$ | $7,8.10^3$ | 1,3 |
| 10 | $5,0.10^3$ | $5,6.10^3$ | 1,1 |
| 15 | $4,8.10^3$ | $4,1.10^3$ | 0,82 |
| 20 | $4,4.10^3$ | $4,2.10^3$ | 0,95 |

Dénaturation et traitement par l'acide persuccinique : mêmes conditions que tableau IV

Renaturation : après dialyse contre 4x300 volumes NaCl 0,3M citrate 0,03M, 1 heure à 67° puis refroidissement lent.

Les chiffres (x) et (xx) correspondent respectivement à 6% et à 48,5% de l'activité transformante de l'ADN natif de départ (ADN N 661)

Des lésions crées par l'acide persuccinique sur l'ADN dénaturé inhibent donc sa renaturation.

Nous connaissons deux types de lésions que l'acide persuccinique peut induire sur l'ADN natif : modification de ses bases, création de liaison covalente. La non-renaturation de l'ADN traité à l'état dénaturé par le peracide succinique pourrait, selon ces données, dépendre soit d'une diminution de la capacité d'appariement des bases modifiées par peroxydation, soit de ce que le peracide succinique provoque la formation de liaisons covalentes entre les constituants d'un même brin d'ADN; enfin, l'ADN traité, à l'état dénaturé pourrait présenter une plus grande sensibilité à l'hydrolyse, au cours de la renaturation, que l'ADN non traité. La première hypothèse ne peut expliquer aisément les effets observés, car le taux de formation des dérivés de peroxydation des bases n'est pas notablement augmenté par la dénaturation préalable de l'ADN (H.SCHWEITZ 1967), et ces dérivés de peroxydation, présents dans un ADN traité à l'état natif par le peracide succinique, ne semblent pas empêcher la renaturation de l'ADN (tableau IV). On ne peut exclure la possibilité qu'un ADN, traité à l'état dénaturé par le peracide, ne subisse, au cours de sa renaturation, une hydrolyse particulièrement rapide ; toutefois, l'importance et surtout la rapidité avec laquelle s'établit l'effet inhibant du peroxyde sur la renaturabilité de l'ADN, laisse penser qu'un très petit nombre de lésions suffit à provoquer cet effet. La formation de liaisons covalentes entre des constituants d'un même brin d'ADN, serait le type de lésion susceptible de rendre compte des effets rapides observés.

En conséquence, les mutations que nous avons pu observer, induites sur l'ADN d'Hemophile par le peracide succinique, étaient toujours le résultat de modifications au niveau de segments d'ADN natif.

# DISCUSSION DES RESULTATS ET CONCLUSIONS

Notre étude de l'action in vitro de l'acide persuccinique sur l'ADN d'Hemophile a mis en évidence les effets suivants :

L'acide persuccinique à pH7 inactive l'ADN d'Hémophile selon une cinétique de premier ordre : la diminution de l'activité transformante de chacun des marqueurs liés S, K et N, et également de groupes de 2 ou 3 marqueurs, est exponentielle; elle met en évidence une sensibilité différente des trois marqueurs à l'action du peracide, le marqueur S étant deux fois plus sensible que le marqueur N, le marqueur K ayant une une sensibilité = 1,6 par rapport à celle de N ; le taux d'inactivation simultanée de 2 marqueurs montre que les lésions sur les marqueurs éloignés S et N, ou K et N, sont additives, mais par contre fait apparaître un effet de chevauchement pour les marqueurs proches S et K.

L'acide persuccinique provoque la formation de ponts covalents entre les deux hélices de l'ADN natif. Ce type de lésionss'ajoute à la peroxydation des bases de l'ADN par le peracide (D.LUZZATI et coll.1961; H.SCHWEITZ 1967).

Les mêmes liaisons covalentes pourraient se former entre les bases d'un même brin d'ADN: l'ADN traité à l'état dénaturé par le peracide ne se renature pas.

Une action mutagène du peracide succinique sur l'ADN d'Hémophile a été mise en évidence; l'ADN peut acquérir, par action du peracide, les caractères de résistance à la Kanamycine et à la viomycine. L'effet mutagène ne concerne

que deux caractères sur les 5 que nous avons étudiés. Ceci serait en faveur d'une action mutagène spécifique du peracide. Toutefois l'accroissement du nombre de mutants est faible et surtout irrégulier et n'a pas été reproduit dans toutes nos expériences.

---

Nous analyserons d'abord les résultats d'inactivation des marqueurs de l'ADN par l'acide persuccinique.

Nous avons essayé d'estimer l'effet des deux catégories de lésions inactivantes produites par le peracide, en évaluant d'une part le nombre de bases modifiées et d'autre part le nombre de ponts covalents formés, au cours de nos expériences.

Le nombre de bases peroxydées a pu être évalué à partir des données de H.SCHWEITZ (Thèse 1967); il est, en valeur moyenne pour les 4 bases de l'ADN égal à 4 à 7% après 6o minutes de traitement de l'ADN par le peracide, dans les conditions expérimentales que nous avons utilisées. A ce moment les marqueurs S,N et K présentent un taux d'inactivation (Fig.1,2 et 3) qui correspond respectivement à 1,5, o,75 et 3 lésions inactivantes par marqueur.

J.H.STUY (Thèse 1961) a estimé la taille approximative de ces mêmes marqueurs, en nombre de nucléotides,: 46o pour le marqueur N et 138o pour les marqueurs S et K.[x] Si, après 6o minutes d'action de l'acide persuccinique 4% des bases de l'ADN ont été modifiées, il y aurait en moyenne 1 lésion inactivante par marqueur N lorsque 12 bases du mar-

---

x Cette estimation a été faite sur la base de résultats d'inactivation d'ADN d'Hemophile par la DNAse pancréatique et par des radiations ionisantes; elle donne un ordre de grandeur, comparatif, des tailles des marqueurs liés de l'ADN d'Hemophile.

queur ont été peroxydées; de même il y aurait 17,7 et 19,3 bases peroxydées par marqueur S et K respectivement lorsqu'ils ont reçu 1 lésion inactivante. En conséquence toutes les modifications de bases n'ont sans doute pas un effet inactivant.

Ceci nous amène à formuler l'hypothèse suivante: seuls certains types de dérivés de peroxydation- n'intéressant peut-être qu'une seule des 4 bases de l'ADN- auraient un effet inactivant, étant donné que de nombreuses modifications, dûes à l'action de l'acide persuccinique semblent être peu importantes, n'empêchant ni l'intégration de l'ADN modifié, ni l'expression de l'information génétique apportée par l'ADN exogène à la bactérie réceptrice.

Le nombre de ponts covalents formés par le peracide sur l'ADN, est évalué d'après l'effet de ces ponts sur les propriétés physiques de l'ADN. On sait qu'un seul pontage par molécule d'ADN de masse $16.10^6$ daltons suffit pour empêcher la dénaturation irréversible de la molécule (E.F.BECKER et coll. 1964; M.R.CHEVALLIER et M.L.GRETH, en préparation), lorsque le pontage est dû à l'action de l'acide nitreux. Si nous supposons que l'effet des ponts formés par l'acide persuccinique sur l'ADN est le même, nous pouvons faire l'estimation suivante: nos résultats indiquent (tableau IV) qu'après un temps de traitement de 60 minutes par le peracide, 46% des molécules présentes dans la préparation ne sont plus sensibles à la dénaturation thermique; à ce moment il y aurait alors 0,62 ponts en moyenne par molécule d'ADN .

Ce type de lésion semble donc très peu fréquent, par rapport au nombre de bases modifiées. Il ne doit pas intervenir de façon appréciable dans l'inactivation des marqueurs par l'acide persuccinique. E.F.BECKER et coll.1964 ont d'ailleurs

montré que la présence d'une liaison covalente n'enlève pas à l'ADN sa propriété de molécule transformante.

La fréquence des pontages (o,62 par molécule) ne peut expliquer celle des lésions inactivant à la fois 2 marqueurs S et K (1,3 lésions par segment d'ADN équivalent à la région génétique S-K. Il semble donc que l'effet de chevauchement observé pour les marqueurs S et K soit dû essentiellement aux modifications de bases à effet inactivant.

Le mécanisme par lequel une modification d'une base de l'ADN peut inactiver 2 marqueurs proches peut être de 2 sortes:

1°)Si, la présence d'une base modifiée n'empêche pas l'intégration de l'ADN dans le génome récepteur, un marqueur comportant une telle lésion inactivante pourrait être intégré dans l'ADN bactérien. Pour que ce marqueur inactif devienne responsable de l'inactivation d'un autre marqueur il faudrait que l'effet inactivant de la lésion se propage à cet autre marqueur. Ceci ne peut se faire que par un empêchement à l'expression phénotypique du 2ème marqueur. Une telle éventualité ne peut avoir lieu que si l'expression phénotypique des fonctions correspondant aux deux marqueurs est coordonnée. En ce qui concerne les fonctions spécifiées par les marqueurs S et K, il n'y a actuellement aucune donnée permettant de les considérer comme faisant partie d'un même opéron.

2°)Si par contre, l'effet d'une lésion inactivante est d'empêcher l'intégration de la région d'ADN qui porte cette lésion, il est assez aisé d'expliquer l'inactivation simultanée de 2 marqueurs très proches, du fait d'une seule lésion. En effet les segments d'ADN qui sont intégrés au cours du processus de la transformation semblent être de grande taille: (N.NOTANI et S.H.GOODGAL 1966)

Nous avons réalisé certaines expériences visant à mettre en évidence la récupération d'un marqueur inactivé, par recombinaison intraallélique avec l'allèle sensible porté par l'ADN endogène. Ces expériences n'ont donné que des résultats négatifs. Encore que ces résultats ne soient pas extrèmement significatifs vu le nombre trop restreint de recombinaisons essayées, ils pourraient venir à l'appui de l'hypothèse d'une non intégration des marqueurs inactivés.

Des expériences faites par ailleurs selon la technique de J.H.STUY(1961) en vue de préciser si les marqueurs inactivés par l'acide persuccinique sont intégrés dans l'ADN intrabactérien, ont toutes donné également une réponse négative.

---

Les résultats que nous avons obtenus dans la recherche d'une action mutagène de l'acide persuccinique sur l'ADN in vitro : action mutagène faible et spécifique, pourraient confirmer dans une certaine mesure, l'interprétation de l'effet mutagène du peracide in vivo (M.R.CHEVALLIER 1964) selon laquelle cet effet serait dû à une action directe de l'acide persuccinique sur l'ADN intrabactérien.

E.FREESE et E.BAUTZ-FREESE (1966) ont confirmé l'action mutagène du peracide sur l'ADN in vitro. Toutefois, comparant son effet mutagène à celui d'autres agents sur l'ADN de Bacillus subtilis, ils montrent que le taux de mutations induites par le peracide (corrigé en fonction du nombre de marqueurs inactivés) n'est que de o,1%, alors que le taux de mutations induites par l'acide nitreux et l'hydroxylamine pour le même marqueur génétique est respectivement égal à 1,7% et à 6%. Un calcul analogue nous a donné une valeur de o,17% pour la mutation de l'ADN d'Hémophile vers la résis-

tance à la viomycine dans l'expérience la plus favorable (exp.2 tableau I). Les mutations recherchées sur l'ADN de Bacillus subtilis (mutations donnant lieu à une perte de fonction) sont très appropriées à la mise en évidence d'une action mutagène, même faible, d'un agent sur l'ADN in vitro. Nous pouvons donc conclure que l'acide persuccinique est peu mutagène sur l'ADN.

Le faible effet mutagène de l'acide persuccinique peut être dû:

- soit à une faible proportion de modifications de bases à effet mutagène parmi le nombre total de bases modifiées par le peracide.

- soit à la non-intégration des bases dont la modification a un effet inactivant, empêchant ainsi la mise en évidence de mutations portées par les segments génétiques adjacents.

Toutefois il est possible que l'effet mutagène d'un plus grand nombre de modifications de bases pourrait être établi si l'on pouvait les mettre en évidence par action du peracide sur l'ADN dénaturé. Cette hypothèse n'a pas pu être vérifiée, l'ADN d'Haemophilus ne se renaturant plus lorsqu'il est traité à l'état dénaturé par l'acide persuccinique.

## 2ème PARTIE

# ACTION DES ULTRA-SONS SUR L'ADN D'HEMOPHILE

- ≠ Introduction
- ≠ Dépolymérisation et Inactivation de l'ADN d'Hemophile
- ≠ Sensibilité des différents marqueurs liés de l'Hemophile à l'action inactivante des ultra-sons. Effet de leur action sur la liaison des marqueurs.
- ≠ Action des ultra-sons sur l'ADN en présence d'AET.
- ≠ Pouvoir compétitif d'ADN dégradé par ultra-sons.
- ≠ Discussions et Conclusions

# INTRODUCTION

Nous avons étudié l'effet inactivant, sur l'ADN transformant d'Hemophile, des ruptures dépolymérisantes produites par les ultra-sons. Nous avons par là même essayé d'établir si l'emploi d'ultra-sons pourrait constituer une méthode de laboratoire intéressante en vue de fractionner des macromolécules en petits segments dont l'intégrité biologique serait conservée.

Le mécanisme de dépolymérisation de l'ADN par les ultra-sons était soumis à des hypothèses diverses lorsque nous nous sommes proposés d'entreprendre cette étude. Ces hypothèses étaient formulées à partir de résultats qui avaient été obtenus par plusieurs chercheurs et groupes de travail dans des conditions expérimentales variées, et qui ne pouvaient être facilement comparées, les paramètres mis en jeu et leur influence sur les résultats obtenus étant mal précisés. Les résultats de ces travaux sont les suivants:

1) Différentes conditions expérimentales étaient proposées par les différents auteurs pour dépolymériser l'ADN par ultra-sons : la dépolymérisation a été réalisée par P.Doty et coll. (P.DOTY et coll.1958 et M.LITT et coll.1958) tant sous atmosphère d'azote que sous air, et dans ce deuxième cas tant en présence qu'en absence d'AET[x]. Les résultats obtenus dans ces différentes conditions n'ont pas été comparés.

---

xAET = Aminoethylisothiourée, capteur de radicaux libres et protecteur des milieux irradiés contre leurs effets radiochimiques : selon D.G.DOHERTY, R.SHAPIRA et W.T.BURNETT (publications 1957. Voir Méthodes expérimentales)

O.C.RICHARDS et P.D.BOYER (1965)constatent une chute de masse plus importante lors de dégradation sous azote que sous air. C.FRONTALI,par contre, n'observe aucune dépolymérisation s'il opère sous air en présence d'AET, même après 3o minutes de traitement à looo kc/s, alors qu'en absence d' AET 2 minutes de traitement suffisent pour dégrader un pourcentage élevé des molécules d'ADN présentes.

2) Selon P.DOTY et coll., l'ADN serait coupé par les ultrasons en segments ayant conservé une structure hélicoïdale intacte; les ruptures dépolymérisantes auraient lieu au hasard sur la double hélice d'ADN. Par contre selon C.FRONTALI les ruptures dépolymérisantes n'ont pas lieu au hasard le long de la chaîne d'ADN mais tendent vers une homogénéisation des longeurs des fragments produits et auraient lieu de préférence, ou vers le milieu d'une chaîne d'ADN considérée, ou bien en des points fragiles de la molécule.

3)O.C.RICHARDS et P.D.BOYER précisent que les ruptures se font sur les liaisons phosphate-sucre des chaînes polynucléotidiques et ont lieu pour 9o% entre C et O et pour lo% entre O et P. Les ruptures ne touchant qu'un seul brin de l'ADN seraient négligeables.

4) S'interrogeant sur le mécanisme responsable de la formation de ces ruptures, ils émettent l'hypothèse, également proposée par C.FRONTALI, que la dépolymérisation serait dûe aux effets de tension créés dans la solution irradiée par les phénomènes de cavitation.

Les effets biologiques de l'action des ultra-sons sur l'ADN avaient été étudiés par M.LITT et coll.(1958) en utilisant l'ADN transformant de Pneumocoque et par B.J.BARNHART

et R.M.HERRIOTT (1963) qui ont utilisé l'ADN d'Hemophile. Les points importants de ces travaux sont les suivants:

M.LITT et coll. précisent que s'ils traitent de l'ADN par les ultra-sons (9kc/s, 5o watts) en présence d'AET (5%) ils éliminent des phénomènes secondaires de dégradation de l'ADN qui sont de faible importance mais qui se surajoutent lors d'irradiation sous air.
Dans ces conditions (sous air,+AET) l'activité transformante du marqueur S diminue exponentiellement en fonction du % de liaisons phosphate-sucre rompues dans l'ADN; le domaine de chute de masse étudié est de 3,5 $1o^6$ à $3.1o^5$ daltons.
Des taux d'inactivation analogues étant observés pour cinq marqueurs génétiques, non liés, de l'ADN de Pneumocoque, les auteurs en concluent que la cible de ces marqueurs ($1.1o^6$ daltons), est en fait la taille limite inférieure que doit présenter un segment d'ADN pour être à même d'induire une transformation bactérienne.

B.J.BARNHART et coll. comparent l'inactivation de l'ADN d'Hemophile en présence et en l'absence d'AET; Ils confirment l'effet protecteur de l'AET mais montrent que celui-ci ne se manifeste qu'après un certain temps d'action des ultra-sons. Ces auteurs ont étudié parallèlement, en fonction de la durée de traitement par ultra-sons, d'une part la diminution de l'adsorption et de la fixation irréversible de l'ADN (marqué au $P_{32}$ )par les bactéries compétentes, et d'autre part la perte de l'activité transformante du marqueur de résistance S ; lorsque cette activité transformante est à $1o^{-3}$ de l'activité initiale, l'adsorption de l'ADN, première étape de la transformation, n'a baissé que d'un facteur 5, et, fait plus surprenant encore, 6o% de l'ADN est toujours retenu irréversiblement par les cellules bactériennes. Les auteurs en

déduisent que les bactéries peuvent vraisemblablement absorber des fragments d'ADN qui présentent des lésions les rendant biologiquement inactifs, s'ils ont conservé une taille suffisante pour être capables d'interaction avec les sites récepteurs bactériens.
Dans ce travail les auteurs n'ont malheureusement pas fait de mesures de masse des échantillons d'ADN testés ; la taille de l'ADN est définie par les seules durées de traitement par ultra-sons.

Des recherches effectuées par R.LITZLER dans le même laboratoire , ont servi de point de départ à notre travail. R.LITZLER a étudié la phénoménologie de la dégradation ultra-sonore. Il a précisé la nature et l'importance des paramètres susceptibles d'influencer le résultat de l'action des ultra-sons et a analysé l'évolution de la morphologie des molécules d'ADN soumises à ces traitements : il a comparé la dégradation de l'ADN sous atmosphère d'azote,d'air et d'oxygène et étudié l'influence de l'intensité du faisceau d'ultra-sons d'une part, de la concentration de la solution en ADN d'autre-part sur la dégradation de l'ADN de thymus de veau et de E.Coli.
Ayant déterminé le seuil de cavitation à la fréquence d'ultra-sons utilisée (20kc/s), R.LITZLER montre qu'il y a corrélation entre dépolymérisation d'ADN par ultra-sons et phénomène de cavitation.
Lorsqu'il opère sous air à puissance acoustique inférieure à 50 watts sur des solutions d'ADN peu concentrées : 50 à 250µg/ml, il observe deux phases dans la dépolymérisation au cours du temps: une première chute de masse très rapide, s'atténue, puis s'arrête lorsque la valeur de $M_w$ est de l'ordre de 4 à $5.10^5$ daltons; elle est suivie d'une deuxième chute

de masse beaucoup plus faible et plus lente ; le plateau de masse, fin de la première cinétique, est d'autant plus long que la concentration de l'ADN ou que la puissance du faisceau ultra-sonore sont plus faibles. R.LITZLER déduit de ces résultats que la première cinétique est dûe à des ruptures qui ont lieu en des points spécifiques de la molécule d'ADN, particulièrement sensibles aux effets de tension créés dans la solution au dessus du seuil de cavitation ; il rejoint ainsi C.FRONTALI dans ses conclusions : ces ruptures tendent à homogénéiser la longueur des fragments d'ADN qui dans la préparation initiale sont polydisperses. L'auteur interprète la deuxième cinétique comme résultant de ruptures monocaténaires de l'ADN, ayant lieu au hasard, qui seraient dûes à la présence de radicaux libres dans les solutions irradiées sous air (voir conclusions).
A puissance acoustique plus élevée, la dépolymérisation de l'ADN est beaucoup plus rapide et on n'observe pas de palier de masse ; ceci expliquerait l'absence de courbes à transition dans les travaux de P.DOTY et coll.

Nous avons mis à profit l'existence d'un palier de masse dans la dégradation d'ADN par ultra-sons, palier que l'on a également retrouvé en traitant l'ADN d'Hemophile dans les conditions opératoires préconisées par C.SADRON et R.LITZLER, pour préciser s'il y a corrélation entre les ruptures dépolymérisantes subies par l'ADN et l'inactivation de ses marqueurs génétiques. Les résultats obtenus ayant indiqué que des phénomènes inactivants supplémentaires pourraient intervenir, nous avons alors abordé l'étude de l'inactivation de l'ADN par action des ultra-sons en présence du capteur de radicaux ( AET ) déjà utilisé par les auteurs précités.

Nous avons étudié l'effet inactivant des ultra-sons sur les trois marqueurs liés de l'Hemophile et nous l'avons analysé en fonction de la dépolymérisation que subit l'ADN.
Nous avons examiné la possibilité de déliaison, par ultra-sons, des marqueurs S et N de l'Hemophile.
Si les radicaux libres formés dans les solutions irradiées participent à l'inactivation de l'ADN, c'est en présence d'un corps comme l'AEt que l'on peut espérer mettre en évidence de la façon la plus nette une déliaison de marqueurs actifs.
Par des tests mettant en compétition de l'ADN traité par ultra-sons et de l'ADN natif, nous avons précisé l'effet des ultra-sons sur la première des deux phases importantes de la transformation bactérienne.

Ce travail a été réalisé en collaboration avec R.LITZLER en ce qui concerne l'aspect physique des expériences.

## DEPOLYMERISATION ET INACTIVATION DE l'ADN D'HEMOPHILE PAR LES ULTRA-SONS

Comme les autres ADN étudiés précédemment par R.LITZLER (1964) : ADN de thymus de veau et ADN d'Escherichia Coli, l'ADN d'Hemophile subit une dépolymérisation par ultra-sons, qui, dans les conditions opératoires que nous avons utilisées[x], n'est pas linéaire en fonction de la durée de traitement (fig.1). Une première cinétique de dépolymérisation très rapide se termine par un palier de masse, situé dans nos conditions opératoires entre 3 et 6 minutes de traitement, et ayant lieu lorsqu'une masse de 44o.ooo daltons a été atteinte; la dégradation ultra-sonore a ensuite été poursuivie jusqu'à obtention de masses d'ADN de 2oo.ooo - 27o.ooo daltons.

Les déterminations de masse ont été faites par diffusion de la lumière et/ou par sédimentation. Les valeurs de masse que nous avons obtenues par les deux techniques sont comparables, exception faite de celles de l'ADN non dégradé ; les masses supérieures à $6{,}1o^{6}$ daltons sont, selon D.FROEHLICH et coll.(1963) sous-estimées par diffusion de la lumière.

Des courbes de fusion réalisées sur les échantillons d'ADN dégradées jusqu'à des masses de 44o.ooo daltons ont montré que les fragments obtenus conservent une structure secondaire native et présentent la même hyperchromicité de 4o% mesurée à 1oo°C que l'ADN témoin.

---

x Conditions expérimentales : 5o ml de solution d'ADN SKN 564 5o µg/ml dans ClNa o,18M, citrate o,o2M, sont soumis, à la fréquence de 2okc/s., à un faisceau d'ondes de puissance 32,4watts.

Figure 1

DEPOLYMERISATION DE L'ADN D'HEMOPHILE PAR LES ULTRA-SONS

L'ADN SKN 564 a été traité par ultra-sons à la puissance acoustique de 32,4 watts dans un desintégrateur travaillant à la fréquence d'ondes de 2okc/s.[x]

Les points expérimentaux donnés dans cette figure correspondent aux durées de traitement suivantes :

| | |
|---|---|
| 15" | $M_w = 1,44.10^6$ |
| 3o" | $o,92.10^6$ |
| 1'3o" | $o,56.10^6$ |
| 3' | $o,47.10^6$ |
| 4'3o" | $o,44.10^6$ |
| 6' | $o,44.10^6$ |
| 1o' | $o,27.10^6$ |

La masse des échantillons d'ADN a été déterminée par diffusion de lumière ; la masse $M_w$ de l'ADN SKN 564 est évaluée par cette technique à $8,35.10^6$ daltons. Ci-dessus nous précisons la masse des échantillons dégradés.

x Toutes les précisions sont données dans le chapitre "Méthodes expérimentales". Pour les caractéristiques de l'ADN voir, dans le même chapitre, sous "Matériel".

ULTRA-SONS
8
6
4
2
0
Mw·10⁻⁶ daltons
0
2
4
6
8
10
MINUTES

Ces conditions sont détaillées dans le chapitre "Méthodes expérimentales" et reprécisées fig1.

La cinétique de dégradation biologique de l'ADN, traité par ultra-sons, a été étudiée essentiellement par des tests de transformation dans lesquels l'ADN était présent à concentration saturante.

En effet, la chute d'activité transformante de l'ADN apparaît comme extrêmement importante dès le début du traitement par ultra-sons : après une minute de sonolyse, l'activité résiduelle des marqueurs N et S-N, n'est plus, respectivement, que de 2,15% et o,1% si les tests de transformation sont réalisés à saturation d'ADN (1µg/ml); à concentration non saturante d'ADN (o,o1µg/ml), ces valeurs descendent à o,65% et à o,o4% ; or cette dernière valeur est déjà trop faible pour être évaluée avec une bonne précision. Dans les tests où l'ADN est utilisé à concentration non saturante, le faible nombre de bactéries transformées ne peut donc permettre l'étude du transfert de résistance multiple ; il rend également impossible l'étude de la cinétique d'inactivation des différents marqueurs dans toute la zone de chute de masse étudiée.

La figure 2 montre, par ailleurs, que dans le domaine d'étude où la précision des résultats est satisfaisante, si le taux d'inactivation de l'ADN diffère selon que les bactéries ont été transformées par 1µg ou par $10^{-2}$µg d'ADN, l'allure de la courbe d'inactivation de l'ADN est cependant comparable dans les deux cas.

L'inactivation de l'ADN en fonction de la durée du traitement par ultra-sons est donnée dans la figure 3.(ADN : 1µg/ml de milieu de transformation). La courbe d'inactivation montre que la chute d'activité transformante suit une

cinétique dans laquelle on ne retrouve pas de transition comparable au palier de masse.

Dans la première phase de la dégradation, l'inactivation peut être assimilée à une cinétique exponentielle en fonction du temps. La figure 4. montre, d'une part qu'il n'en est pas de même pour la dépolymérisation, et d'autre part que la chute de masse est initialement plus importante que la diminution d'activité transformante des marqueurs de l'ADN; leur taux de dégradation est cependant comparable. Lorsque la masse de l'ADN tend vers le palier, les deux cinétiques deviennet très différentes (fig.3). L'inactivation n'est plus exponentielle en fonction de la durée de traitement. Il semble alors ne plus y avoir aucune corrélation entre masse et activité transformante de l'ADN : dans la zone du palier de masse l'activité transformante baisse d'un facteur voisin de 1o. Ce résultat, concernant la deuxième cinétique d'inactivation, nous a amené à formuler deux hypothèses :

1° Des phénomènes annexes, touchant la structure fine des segments d'ADN obtenus, pourraient s'ajouter aux lésions dépolymérisantes et participer à l'inactivation de l'ADN.
En vue de vérifier cette hypothèse nous avons effectué certaines dégradations en présence d'AET, capteur de radicaux.

2° La diminution d'activité transformante de l'ADN pendant le plateau de masse pourrait être dûe à la coupure de quelques molécules de grande taille encore présentes dans la préparation d'ADN, dont la masse moyenne en poids a atteint 44o.ooo daltons. Les techniques de détermination de masse

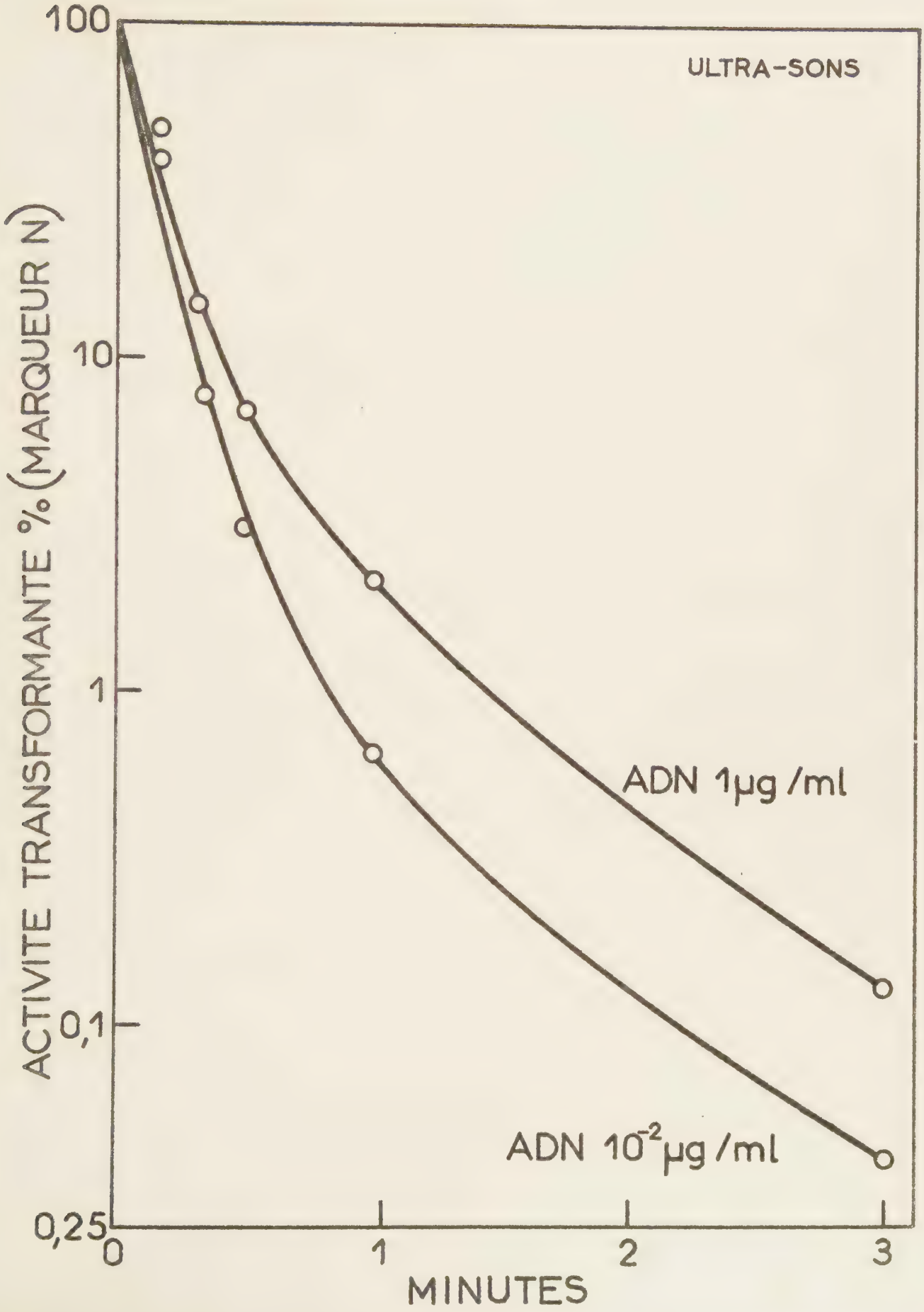
Figure 2

INACTIVATION DE L'ADN D'HEMOPHILE par les ULTRA-SONS

testée à concentration saturante (ADN 1µg/ml) et à concentration non saturante (ADN o,o1µg/ml)d'ADN dans le milieu de transformation.

Conditions de traitement par les ultra-sons : voir figure 1. Masse des échantillons d'ADN, déterminées par sédimentation et nombre de bactéries transformées pour le caractère N (résistance à la novobiocine) :

| | $M_w$ | Nombre de bactéries transformées par ml de milieu de transformation (marqueur N) | |
|---|---|---|---|
| | | par 1µg ADN/ml | par $10^{-2}$ µg ADN/ml |
| ADN Témoin | $12.10^6$ | $7,76.10^6$ | $9,92.10^5$ |
| traité 10" | $1,6.10^6$ | $3,77.10^6$ | $3,87.10^5$ |
| " 20" | $1,15.10^6$ | $1,14.10^6$ | $7,85.10^4$ |
| " 30" | $0,88.10^6$ | $5,42.10^5$ | $3,1 .10^4$ |
| " 1' | $0,55.10^6$ | $1,67.10^5$ | $6,5 .10^3$ |
| " 3' | $0,38.10^6$ | $1,00.10^4$ | $4,0 .10^2$ |

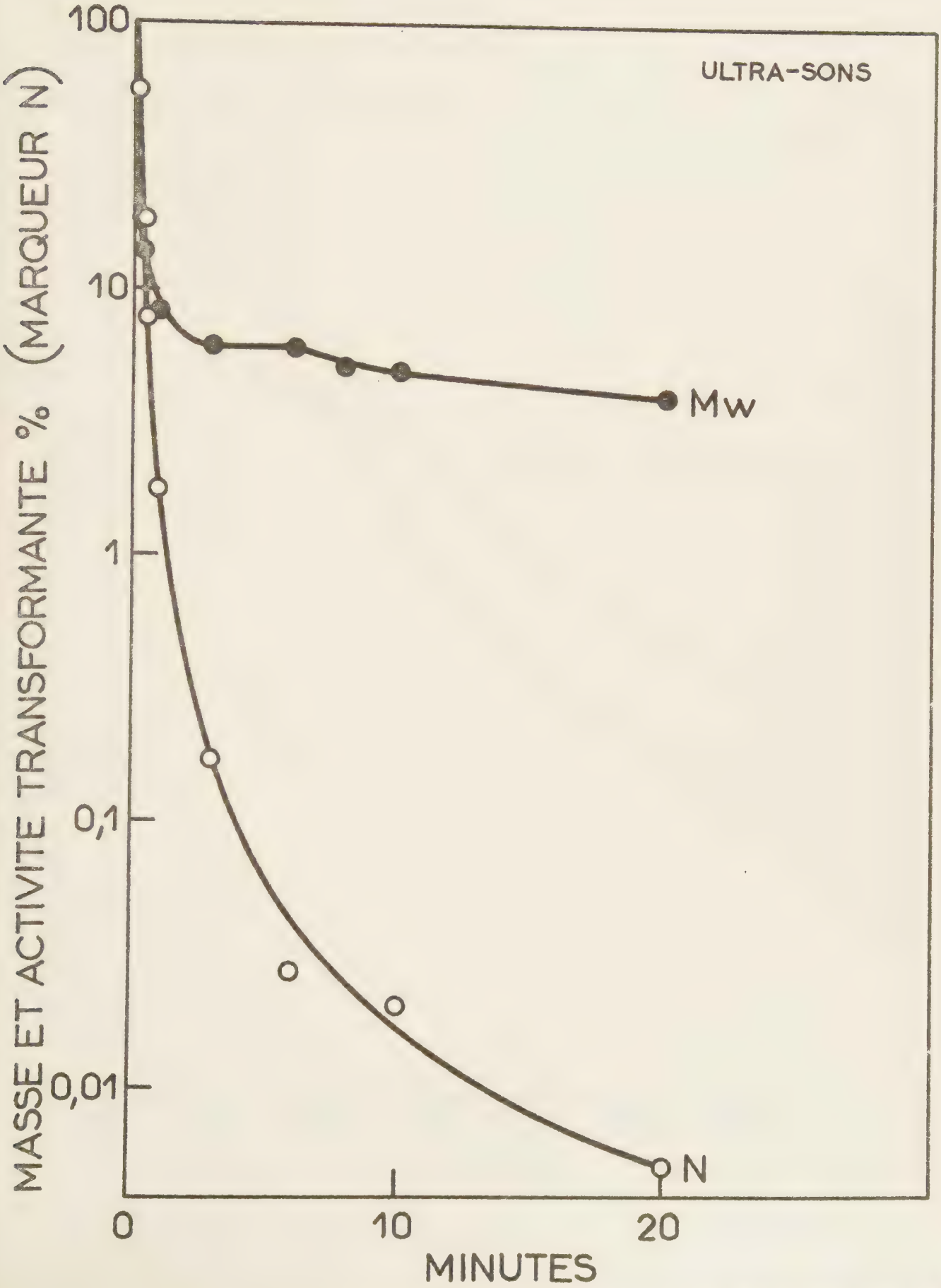

ULTRA-SONS
ACTIVITE TRANSFORMANTE % (MARQUEUR N)
100
10
1
0,1
0,25
0
1
2
3
MINUTES
ADN 1µg /ml
ADN $10^{-2}$µg /ml

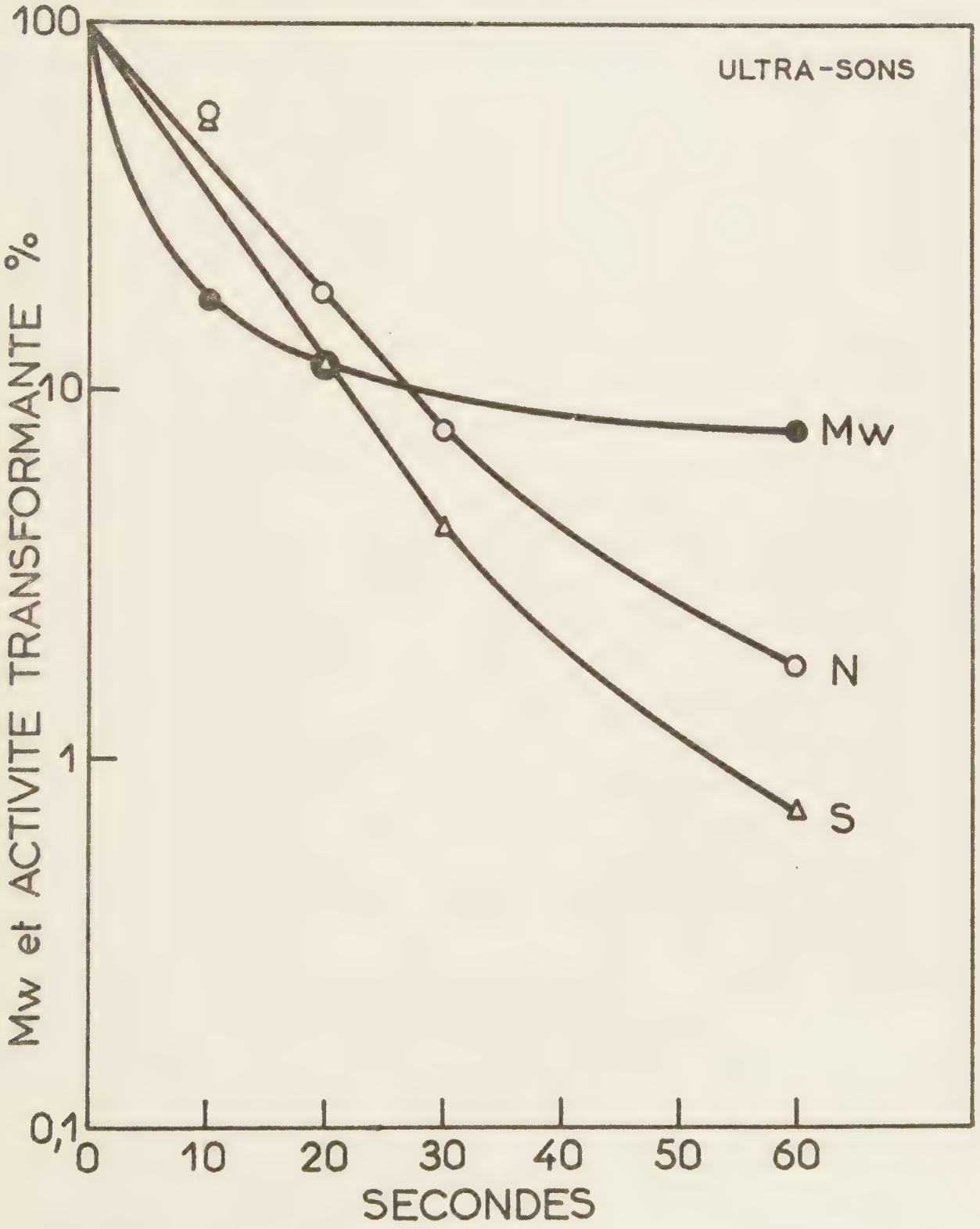
Figures 3 et 4

CHUTE DE LA MASSE ET DE L'ACTIVITE TRANSFORMANTE DE L'ADN d'HEMOPHILE AU COURS DE TRAITEMENT, PAR ULTRA-SONS

---

Les variations sont exprimées en % des valeurs initiales données par l'ADN témoin SKN 564
Conditions de traitement par ultra-sons : voir figure 1.
La masse $M_w$ a été déterminée par sédimentation.
L'activité transformante est donnée pour les marqueurs N et S qui confèrent la résistance à la novobiocine et à la streptomycine. Elle a été testée à concentration saturante d'ADN (1µg/ml)


ULTRA-SONS
100
10
1
0,1
0,01
MASSE ET ACTIVITE TRANSFORMANTE % (MARQUEUR N)
Mw
N
0
10
20
MINUTES


ULTRA-SONS
100
10
1
0,1
Mw et ACTIVITE TRANSFORMANTE %
Mw
N
S
0
10
20
30
40
50
60
SECONDES

ne seraient pas sensibles à cette dépolymérisation restreinte. Toutefois elle aurait un effet important sur l'activité transformante résiduelle de l'ADN : selon M.LITT et coll. (1958), une taille minimale de $1.10^6$ daltons serait requise pour qu'un segment d'ADN puisse exprimer les activités transformantes des marqueurs qu'il porte.

- En vue de mieux apprécier la dépendance de l'activité biologique de l'ADN vis-à-vis de l'action dépolymérisante des ultra-sons, nous avons porté en coordonnées semi-logarithmiques, la chute d'activité transformante de l'ADN en fonction de sa chute de masse (figure 5).

Cette représentation montre une dépendance étroite entre l'activité transformante de l'ADN et un seuil de masse inférieure critique. La masse critique mise en évidence serait de l'ordre de 1 à $2.10^6$ daltons.

La première partie de la courbe correspond à la première phase de la dégradation, exprimée par la figure 4., pendant laquelle on constate un parallélisme assez étroit entre dépolymérisation et inactivation de l'ADN. Au dessus du seuil de masse critique, la variation d'activité biologique est relativement peu importante en considération de la chute de masse subie par la préparation d'ADN. Nous avons estimé, d'après la formule de CHARLESBY (1954), le nombre de ruptures dépolymérisantes subies par l'ADN ($M_w = 12.10^6$) lorsque le marqueur de résistance à la novobiocine, marqueur le moins sensible à l'action des ultra-sons, a reçu, selon la loi de POISSON, une lésion léthale. (Pouvoir transformant restant = o,37. fig.7,8,9 ). Ce nombre, calculé sur la base de la chute de masse de l'ADN déduite des mesures de sédimentation,

est de l'ordre de 2o.[x]; la cible constituée par le marqueur N serait donc de $6.1o^5$ daltons. Le marqueur S et la cible entière SN, qui présentent chacun une lésion léthale lorsque 16 et 1o ruptures ont été introduites dans l'ADN, seraient déterminées respectivement par une région sensible aux ultra-sons égale à $7,5.1o^5$ et $1,2.1o^6$ daltons. Ces déterminations sont approximatives et probablement surestimées, surtout pour le marqueur N : lorsqu'il a reçu une lésion léthale, la préparation d'ADN a une masse moyenne de $1,6.1o^6$ daltons, donc de l'ordre de la "masse critique".

Au dessous du seuil critique de masse, par contre, la figure 5. montre que des chutes brutales d'activité transformante sont liées à de très faibles variations de masse de l'ADN.

L'inactivation, qui suit une cinétique de premier ordre en fonction du temps pendant les premiers temps de traitement (figure 4), n'est plus liée à la durée de traitement mais au carré du temps : figure 6: la chute d'activité transformante et le temps sont liés, en coordonnées doublement logarithmiques, par une droite de pente 2.

C'est donc lorsque la masse tend vers le palier de dépolymérisation et que, d'autre part, le seuil de masse critique diminue l'efficacité de transformation de l'ADN, que les cinétiques de dépolymérisation et d'inactivation prennent une allure très différente en fonction du temps d'action des ultra-sons.

---

x Le nombre de ces ruptures, déduit des valeurs de masse obtenues par diffusion de lumière est égal à 14. Ce chiffre est inférieur au précédent, la masse de l'ADN témoin (non dégradé) étant sous-estimée par diffusion de lumière (D.FROEHLICH et coll. 1963)

Figure 5

ACTIVITE TRANSFORMANTE DE L'ADN D'HEMOPHILE (MARQUEUR N) EN FONCTION DE LA CHUTE DE MASSE DE L'ADN AU COURS DE L'ACTION DES ULTRA-SONS

---

Conditions d'action des ultra-sons : voir figure 1.
Les masses des échantillons d'ADN ont été déterminées par sédimentation ( o et ◻ : résultats de 2 expériences) et par diffusion de la lumière ( △ )

En abscisse : 1) $M_w$ % = masses des échantillons d'ADN dégradés, en % de la masse de l'ADN témoin.

2) $M_w.10^{-6}$ = échelle des masses en valeurs absolues ; elle donne les valeurs de masse obtenues par la technique de sédimentation ; Dans ce cas la masse $M_w$ de l'ADN est évaluée à $12.10^6$ daltons ($M_w = 8,3.10^6$ daltons par diffusion de la lumière)

Transformation bactérienne à saturation d'ADN (1µg/ml)

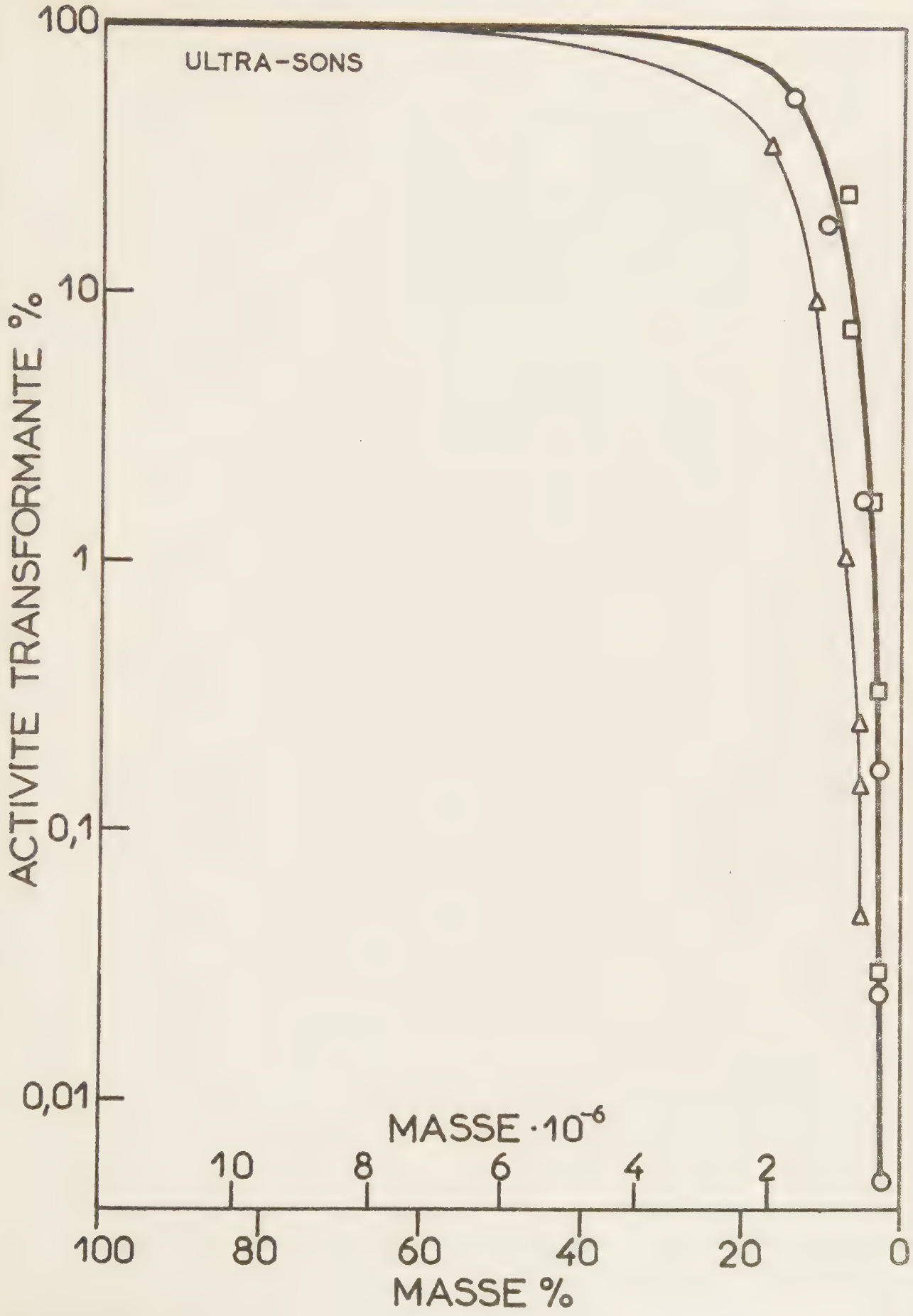

ULTRA-SONS
ACTIVITE TRANSFORMANTE %
100
10
1
0,1
0,01
MASSE ·10⁻⁶
10
8
6
4
2
100
80
60
40
20
0
MASSE %

Figure 6

ACTIVITE TRANSFORMANTE DE L'ADN D'HEMOPHILE EN FONCTION DU TEMPS D'ACTION DES ULTRA-SONS.

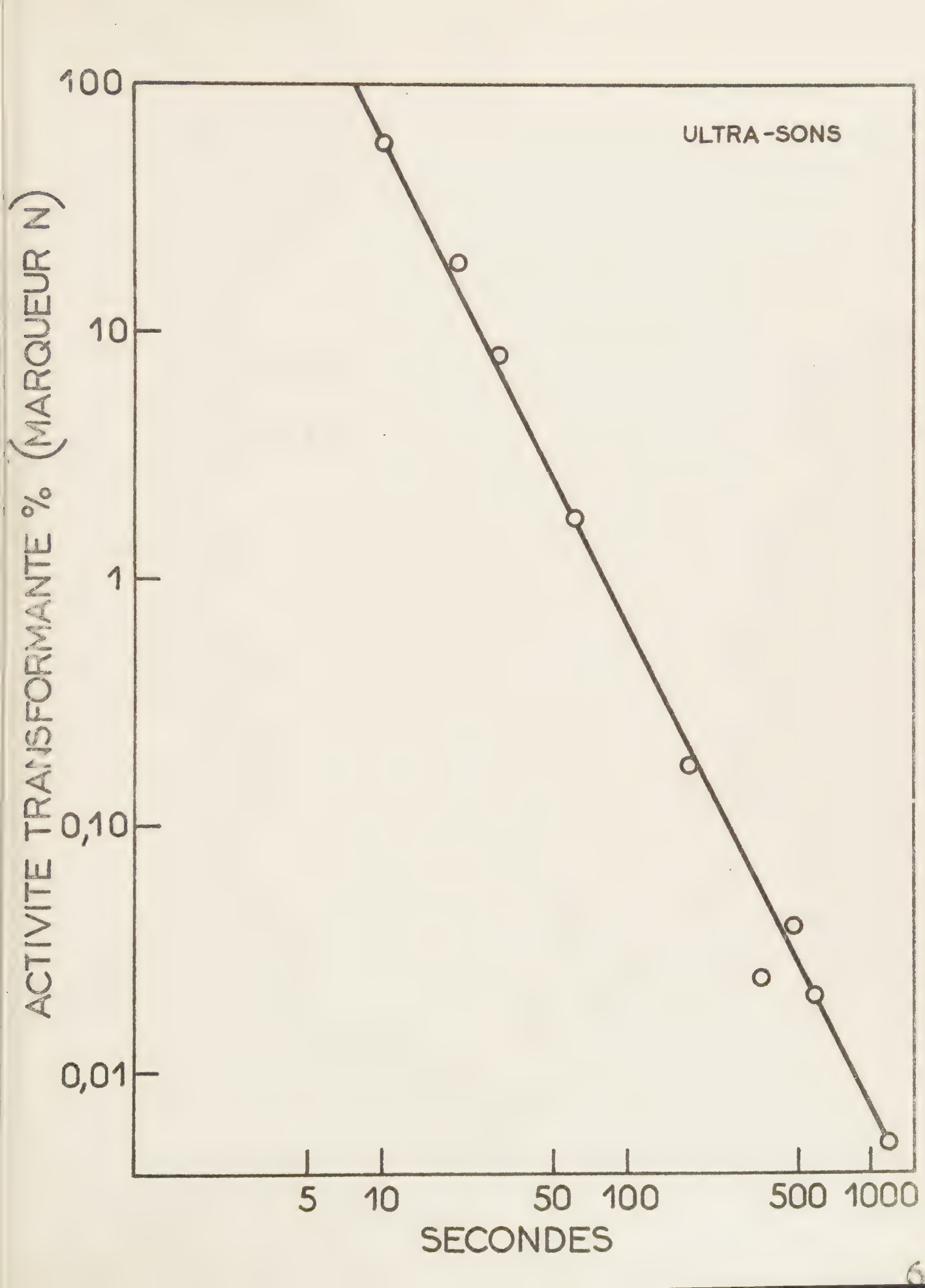
---

Représentation en coordonnées doublement logarithmiques.

1er point : 1o" de traitement : $M_w$ de l'ADN = $1,6.10^6$

dernier point : 2o' de traitement : " = $0,22.10^6$

Conditions de traitement par ultra-sons : voir figure 1.
Activité transformante : marqueur N, testée à concentration saturante d'ADN ( 1µg/ml)


ULTRA-SONS
ACTIVITE TRANSFORMANTE % (MARQUEUR N)
100
10
1
0,10
0,01
5
10
50
100
500
1000
SECONDES

## SENSIBILITE DES DIFFERENTS MARQUEURS LIES DE L'HEMOPHILE A L'ACTION INACTIVANTE DES ULTRA-SONS. EFFET DE CETTE ACTION SUR LA LIAISON DES MARQUEURS .

L'activité transformante des trois marqueurs génétiques liés portés par l'ADN SKN 564 a été comparée, dans les premiers temps de la cinétique de dégradation de l'ADN , assimilable à une cinétique de premier ordre, tant à concentration saturante qu'à concentration non saturante d'ADN. Dans ces deux conditions opératoires les marqueurs de résistance à la streptomycine (S) et à la kanamycine (K) ont montré une même sensibilité au traitement par ultra-sons ;cette sensibilité diffère de celle du marqueur de résistance à la novobiocine (figure 6) et a été évaluée comme étant de l'ordre de 1,26 par rapport à cette dernière.

Dans l'étude de l'inactivation des groupes de marqueurs S-K et S-N, nous avons obtenu les résultats suivants, en comparaison des taux d'inactivation des marqueurs testés séparément :

- Un net effet de chevauchement est observé, dans toutes les conditions expérimentales, pour le groupe de marqueurs S-K, et ceci dès le début de l'inactivation : figure 8. Un certain nombre de lésions inactivent donc simultanément les 2 marqueurs S et K. Ce nombre est sensiblement égal à celui des lésions qui inactivent seulement l'un ou l'autre des deux marqueurs.

- L'inactivation simultanée des marqueurs S et N, étudiée à saturation d'ADN, est égale à la somme des inactivations des deux marqueurs isolés; ce résultat est obtenu

pendant la cinétique exponentielle d'inactivation des marqueurs, c'est-à-dire lorsque le traitement par ultra-sons, dans nos conditions opératoires, n'excède pas une durée de 3o". Lorsque cette durée de traitement est prolongée, le segment S-N est inactivé plus lentement que ne le sont les marqueurs S et N ; un effet de chevauchement important est observé (figure 9). Toutefois cet effet de chevauchement ne peut pas être interprété, la cinétique d'inactivation n'étant plus alors une cinétique de premier ordre.
Par contre, si l'on teste l'inactivation de S-N à concentration non saturante d'ADN, l'effet de chevauchement est manifeste déjà après 1o" de traitement ultra-sonore : figure 1o.

Ces résultats nous amènent à formuler les conclusions suivantes :

1°) Comme à la suite de traitement d'ADN par l'acide persuccinique, nous constatons un effet de chevauchement dans l'inactivation des marqueurs S et K par ultra-sons. Une lésion sur 2 inactive à la fois les deux marqueurs.

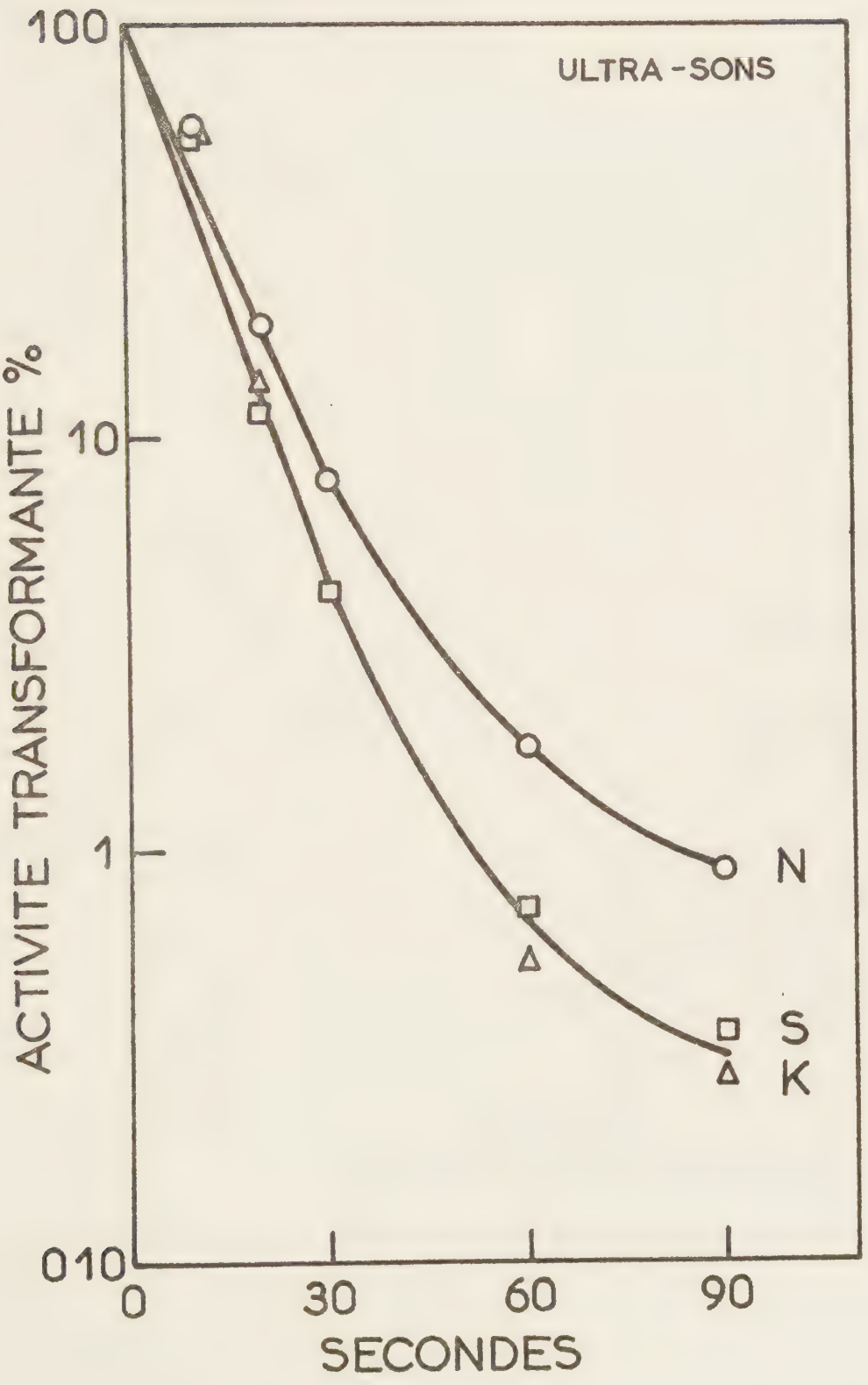
2°) Les résultats que nous avons obtenus, concernant l'inactivation simultanée des marqueurs S et N, laissent sans solution définitive le problème de la séparation de marqueurs par action d'ultra-sons. Néanmoins ils permettent de faire les commentaires suivants :

l'ADN le moins dégradé que nous ayons testé, soumis pendant 1o secondes seulement à l'action des ultra-sons, présente une masse moyenne en poids de $1,6.1o^6$ daltons. Comme le montre la figure 5 cette valeur est déjà très proche ou à l'intérieur de la zone critique de masse qui semble nécessaire à la transformation.
Lorsqu'alors nous prolongeons la dégradation de ces petites molécules d'ADN, le critère de taille des segments d'ADN que

Figure 7

INACTIVATION DES MARQUEURS LIES DE L'HEMOPHILE
S,K et N

Conditions de traitement par les ultra-sons : voir figure 1.
Activité transformante testée à concentration saturante d'
ADN ( 1µg/ml)


ULTRA - SONS
100
10
1
010
ACTIVITE TRANSFORMANTE %
0
30
60
90
SECONDES
N
S
K

Figures 8,9 et 1o

INACTIVATION DES MARQUEURS ET GROUPE DE MARQUEURS LIES DE L'HEMOPHILE

---

Figure 8 :

Inactivation des marqueurs S et K, et comparaison avec l'inactivation simultanée de S et de K (courbe SK).

La courbe en trait discontinu(S+K) représente la somme des inactivations des deux marqueurs S et K testés individuellement.

Test de transformation à concentration saturante d'ADN (1µg/ml)."Effet de chevauchement".

Figures 9 et 1o

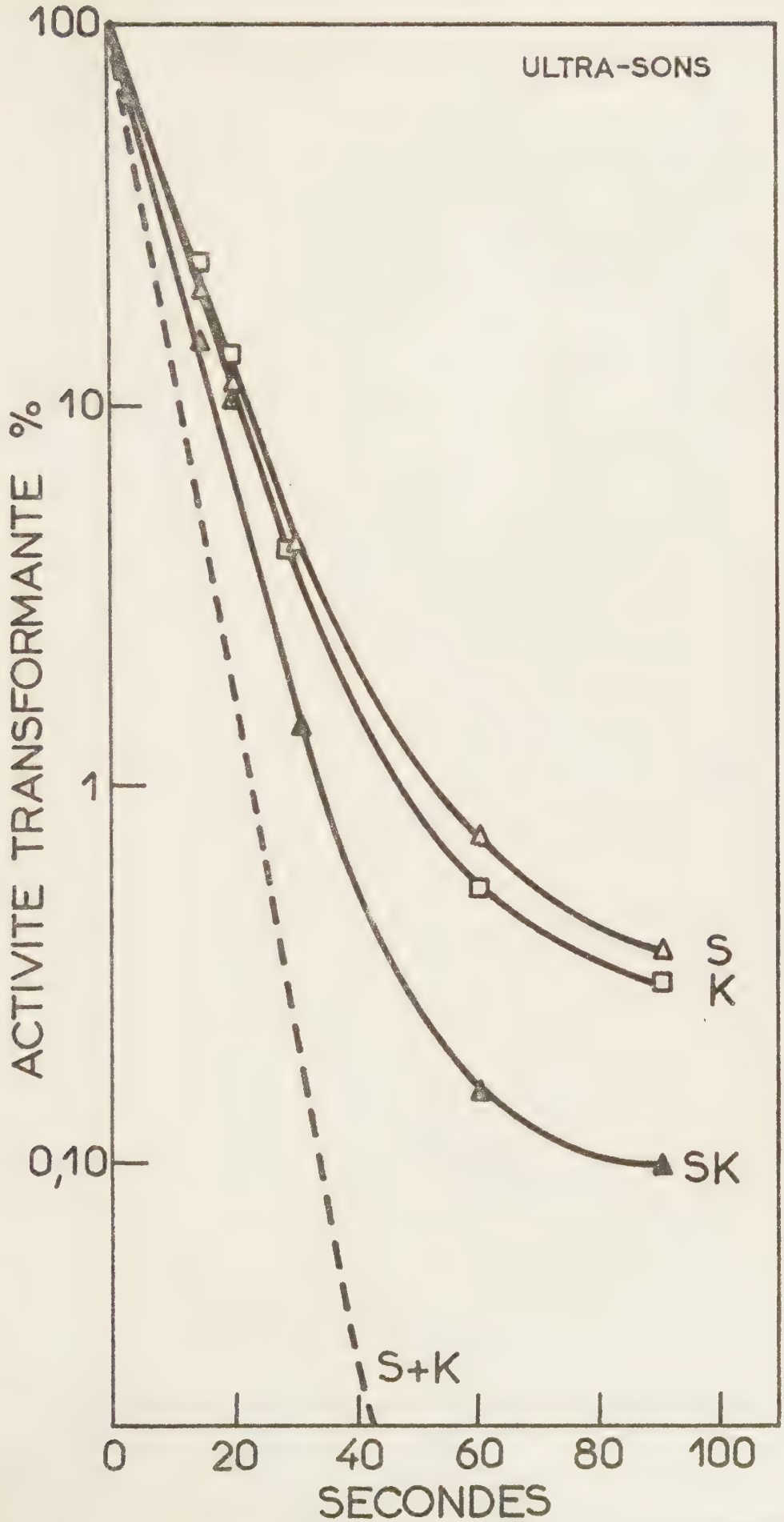
Inactivation des marqueurs S et N , et inactivation simultanée des deux marqueurs (SN).

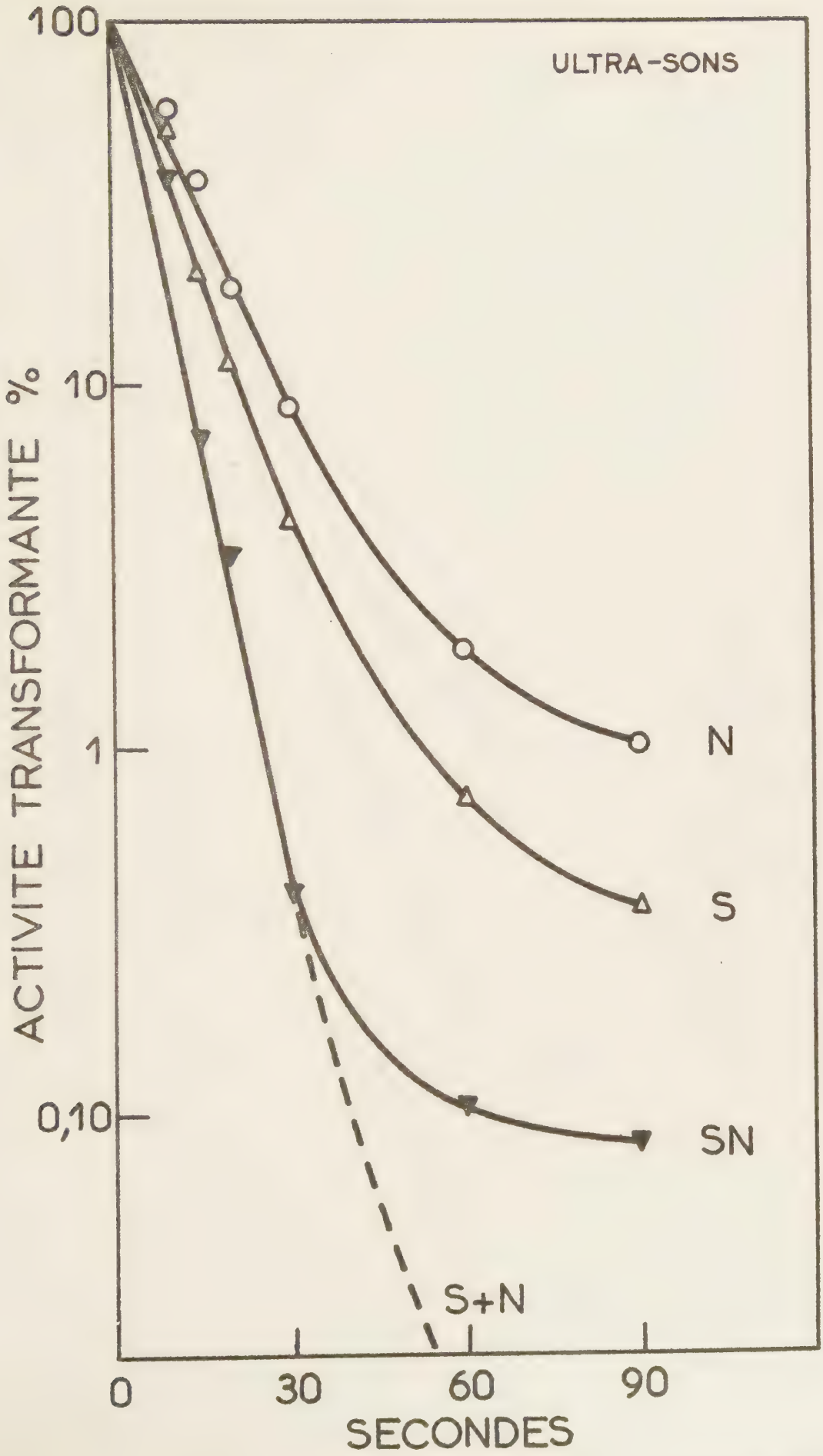
La courbe S+N donne la somme des inactivations individuelles des deux marqueurs : courbe S et courbe N.

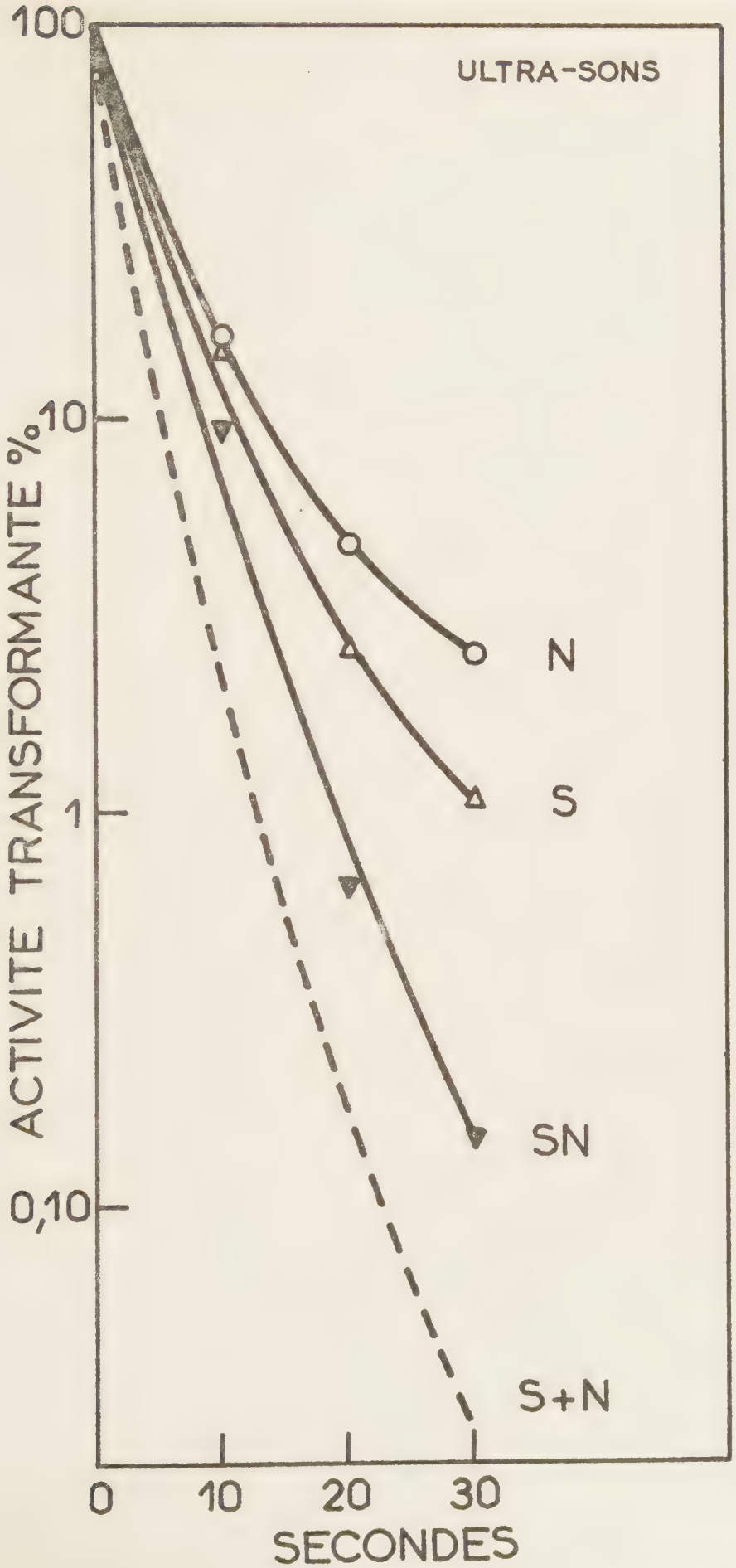
Figure 9 : Activité transformante testée à saturation d'ADN 1µg/ml.
Additivité des lésions jusqu'à 3o" de traitement, puis"effet de chevauchement"

Figure 1o: Activité transformante testée à concentration non saturante d'ADN : o,o1µg/ml.
"Effet de chevauchement"

ADN SKN 564
Conditions opératoires de traitement par ultra-sons :v.fig.1


ULTRA-SONS
100
10
1
0,10
ACTIVITE TRANSFORMANTE %
S
K
SK
S+K
0
20
40
60
80
100
SECONDES


ULTRA-SONS
100
10
1
0,10
ACTIVITE TRANSFORMANTE %
N
S
SN
S+N
0
30
60
90
SECONDES


ULTRA-SONS
100
10
1
0,10
ACTIVITE TRANSFORMANTE %
N
S
SN
S+N
0
10
20
30
SECONDES

nous créons pourra être déterminant dans leur efficacité de transformation. Ainsi, même si une rupture dépolymérisante sépare alors les deux marqueurs S et N, elle pourra en même temps en empêcher l'intégration individuelle, ayant créé deux segments de taille trop restreinte : les deux marqueurs auront été inactivés par une même lésion, il y a effet de chevauchement.

Or le test de transformation à concentration non saturante d'ADN reflète l'activité biologique de toutes les molécules de l'échantillon d'ADN, mis à cet effet en présence des bactéries dans le milieu réactionnel. Par contre lors qu'on opère à saturation d'ADN, il est possible que, dans le mélange hétérogène de molécules en présence en excès, certaines présentent des caractères les favorasant en vue de leur efficacité de transformation; les tests de compétition que nous avons réalisés avec de l'ADN préalablement dépolymérisé par ultra-sons ou par traitements enzymatiques sont en faveur de cette hypothèse : les résultats obtenus, décrits plus loin, montrent que les molécules d'ADN de masse supérieure aux autres ont une priorité de fixation sur les sites récepteurs des bactéries compétentes.

Le test de transformation à saturation d'ADN transcrirait donc l'efficacité de transformation des plus grandes molécules de la préparation d'ADN (qui a, après 1o" et 3o" de traitement, respectivement une masse moyenne en poids de $1,6.10^6$ daltons et $0,9.10^6$ daltons).Les molécules les plus longues de ces préparations ne portent donc pas de marqueurs S ou N seuls, initialement liés.

L'une des raisons possibles de ce résultat pourrait être la participation, déjà envisagée plus haut, de phénomènes annexes qui inactiveraient les marqueurs génétiques situés sur

les segments d'ADN créés par les ruptures dépolymérisantes. Ce point sera abordé dans le chapitre suivant.
Par ailleurs l'effet de chevauchement observé pour ces marqueurs à non saturation d'ADN, a mis en évidence l'importance de la taille des molécules dans l'étude que nous avons poursuivie. Avant de donner à ce problème une réponse définitive il apparaît donc qu'une déliaison de marqueurs devrait être recherchée dans une zone de dépolymérisation allant jusqu'à 6 (au plus 10) ruptures par molécule d'ADN de $M_w$ = 12.$10^6$ daltons.

## ACTION DES ULTRASONS SUR L'ADN, EN PRESENCE D'AET

Deux raisons nous ont incité à poursuivre l'étude de la dégradation d'ADN par ultra-sons en présence d'AET :

- d'une part la différence observée entre l'inactivation et la dépolymérisation de l'ADN, c'est-à-dire le fait que, pendant le palier de masse, l'activité transformante de l'ADN continue à diminuer.
- d'autre part les résultats mentionnés par M.LITT et coll. (1958) et par B.J.BARNHART et coll.(1963)

Les radicaux libres qui se forment dans les milieux soumis à l'irradiation ultra-sonore au dessus du seuil de cavitation (G.FRAENKEL 1940 ; J.WEISS 1944) et en présence d'oxygène (A.J.WEISSLER 1955) participeraient à l'inactivation de l'ADN. L'AET, capteur de radicaux (R.SHAPIRA et coll. 1957), peut protéger en partie certaines phases de la dégradation biologique de l'ADN (B.J.BARNHART et coll.1963); l'activité transformante est alors maintenue, à masse égale d'ADN, à un taux plus élevé (M.LITT et coll. 1958)

Nous avons ajouté ce composé : AET = bromure de la S (2 aminoethyl)isothiourée, à certaines solutions d'ADN avant leur irradiation (voir Méthodes expérimentales). Deux résultats positifs de protection de l'ADN par l'AET ont ainsi été obtenus : tableau I.
L'effet protecteur de l'AET sur l'activité transformante de l'ADN est manifeste surtout dans le test 2 : le marqueur N, après 6 minutes de traitement par ultra-sons, conserve

Tableau I

| ADN | AET quantité ajoutée en % du poids de l'ADN | Durée du traitement par ultrasons | Masse de l'ADN après traitement en absence d'AET | Masse de l'ADN après traitement en présence d'AET | Activité transformante du marqueur N de l'ADN traité en absence d'AET | Activité transformante du marqueur N de l'ADN traité en présence d'AET |
|---|---|---|---|---|---|---|
| DNA N 366(B) $M_w$ =8.900.000 200 µg/ml ou | 5 % | 1' | $0,55 . 10^6$ | $0,55 . 10^6$ | 1% | 1,63 % |
| DNA N 366(A) $M_w$ =11.000.000 | | | | | | |
| 50 µg/ml | 6 % | 6' | $0,308. 10^6$ | $0,285. 10^6$ | 0,35% | 6,53 % |
| " " | 750 % | 6' | | $0,266. 10^6$ | | 6,98 % |

Il a été vérifié que l'activité transformante de l'ADN n'est pas modifiée par les concentrations présentes d'AET.

Conditions expérimentales : L'AET (NBC) est ajouté à la solution d'ADN (ClNa 0,18 M , Citrate 0,02 M) 50 ml de milieu sont soumis à une puissance accoustique de 34,2 watts ; fréquence d'onde 20 kc/s.
La masse des échantillons d'ADN traités à été déterminée par des mesures de sédimentation. L'activité transformante est testée à concentration saturante d'ADN.

Note : Les quantités d'AET ajoutées correspondent, dans le test 2, à $2,5.10^{-6}$ et à $3,75 . 10^{-4}$ g d'AET par ml de solution. Notons que M.Litt et Coll. (1958) et B.J. Bernhart et Coll. (1963) ont ajouté 5 % d'AET (poids/volume) à la solution d'ADN, c-à-d. $5.10^{-2}$ g par ml, soit une quantité d'AET = $1.10^5$% du poids de l'ADN. Nous avons constaté que ces grandes quantités d'AET n'augmentent pas son effet protecteur sur l'ADN.

en présence d'AET un pouvoir transformant augmenté d'un facteur 2o. L'AET semble par contre avoir un effet protecteur beaucoup moins important lorsque la dégradation de l'ADN est moins poussée (test 1.). Ce phénomène apparaît également dans les résultats de B.J.BARNHART et R.M.HERRIOTT (1963)

A la suite de ces résultats préliminaires nous avons alors entrepris d'irradier des solutions d'ADN pendant des temps différents, en l'absence et en présence d'AET, en vue de préciser l'effet protecteur de l'AET au cours de toute la cinétique de dégradation de l'ADN. Pour des raisons qui n'ont pu être expliquées, ces traitements parallèles d'ADN ont donné des résultats tout à fait comparables : l'effet protecteur de l'AET n'a pas été retrouvé. Les différents lots et préparations d'AET essayés, mentionnés dans la partie expérimentale de ce travail, se sont tous révélés inactifs et ont fait échouer notre projet d'étude de toute la courbe de dégradation d'ADN, sans que des réactions d'origine radicalaire ne créent des lésions supplémentaires au niveau de l'ADN.

## POUVOIR COMPETITIF D'ADN DEGRADE PAR ULTRA-SONS

Les résultats qui précèdent montrent que les ultra-sons inactivent l'ADN en solution, par au moins deux mécanismes, donnant lieu :

- l'un à des ruptures dépolymérisantes de la chaîne polynucléotidique initiale,
- l'autre à des lésions à l'intérieur des fragments d'ADN formés.

Nous avons voulu préciser ce qui, dans la perte de pouvoir transformant des molécules d'ADN dégradées, était dû à une diminution de leur capacité de fixation sur les bactéries. L'existence de tests de compétition, employés et analysés par P.SCHAEFFER (1957-1961) permet de distinguer l'étape de la pénétration de l'étape d'intégration de l'ADN au cours de la transformation.

Nous avons ainsi analysé le rôle que joue la taille des molécules de l'ADN au moment de leur pénétration dans les bactéries ; il avait été suggéré par L.S.LERMAN et L.J.TOLNACH (1959) ; par ailleurs L.F.CAVALIERI et B.H.ROSENBERG (1958) avaient constaté que l'ADN de Pneumocoque dépolymérisé par ruptures mécaniques jusqu'à une masse de $2.10^6$ daltons, a perdu la plus grande partie du pouvoir compétitif de l'ADN initial.

Les tests de compétition ont été effectués de la manière suivante : nous avons soumis, comme dans les expériences antérieures, de l'ADN SKN 564 à différents temps de traitement par les ultra-sons ; l'ADN traité (ADN compétiteur) a ensuite été ajouté, à plusieurs concentrations très largement

saturantes, à de l'ADN natif E 465 (ADN transformant);avec ces mélanges des deux ADN, dans lesquels l'ADN E était en concentration saturante, nous avons transformé des bactéries compétentes et étudié leur taux de transformation pour le caractère E. Nous avons ainsi mis en évidence l'inhibition à la transformation par la présence de l'ADN SKN.

La représentation des résultats, dans la forme donnée par les figures 11 et 12, traduit le pouvoir compétitif de l'ADN non traité (T) et des ADN traités (15" à 1o').

Ce pouvoir compétitif vis-à-vis de molécules natives d'ADN de $M_w$ = 14.1o$^6$daltons (DNA E 366), quoique faible, n'est pas perdu pour les ADN traités, même s'ils sont dégradés jusqu'à des masses très basses (tableau II).
Toutefois la figure 11 montre qu'il est très faible par rapport à celui de l'ADN témoin non traité : il est inférieur d'un facteur 8 pour l'ADN traité pendant 15" et qui a gardé une masse moyenne en poids de 1,44.1o$^6$. Par ailleurs la même figure montre que le pouvoir compétitif est du même ordre quelque soit le degré de dépolymérisation de l'ADN.

En fait, la figure 12 qui donne, pour plusieurs échantillons d'ADN compétiteur, les résultats obtenus aux 4 concentrations d'ADN essayées, en précise les caractères suivants : à l'intérieur de certains rapports de concentrations relatives : ADN compétiteur/ADN transformant (les rapports 2o/1;4o/1 et 6o/1 donnent les concentrations respectives d'ADN en poids), on observe que le pouvoir compétitif de l'ADN traité par ultra-sons répond au critère exigé, c'est-à-dire est fonction de sa concentration dans le mélange; le tableau II (colonne 5)donne sa valeur pour le rapport de concentrations = 2o/1 (valeur relative à l'ADN témoin). Par contre au delà de certaines concentrations en ADN compéti-

| Durée du traitement en secondes | Masse de l'ADN par D.L. | | Nbre de ruptures molécule initiale d'ADN | Pouvoir compétitif de l'ADN traité testé à conc. DNA SKN / DNA E | | Pouvoir transformant de l'ADN traité |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | $10^{-6}$ | %T | | 20/1 | 80/1 | |
| (1) | (2) | (3) | (4) | (5) | (6) | (7) |
| 0 | 8,35 | 100 | | 100 | 100 | 100 |
| 15 | 1,44 | 17,2 | 14,5 | 13 | 12,9 | 36,4 |
| 30 | 0,92 | 11 | 24 | 10,2 | 11,5 | 9,55 |
| 90 | 0,56 | 6,7 | 42 | 10,2 | 9,9 | 1,03 |
| 180 | 0,47 | 5,6 | 50 | 7,7 | 7,1 | 0,228 |
| 270 | 0,44 | 5,3 | 54 | 9,2 | 11,2 | 0,148 |
| 360 | 0,44 | 5,3 | 54 | 10,8 | 13,8 | 0,048 |
| 600 | 0,27 | 3,2 | 90 | 13,9 | 41,5 | |

ADN SKN 564 50 µg/ml dans du ClNa 0,18 M citrate 0,02 M. Ultrasons 25 Kc/sec - 34,2 Watts
L'ADN E utilisé comme ADN de référence = ADN E 465 (Mw 11. $10^6$)

(4) Le nombre de ruptures a été calculé d'après A. Charlesby (1954). Le nombre de molécules obten
à partir d'une molécule initiale d'ADN = nombre de ruptures + 1

(5) et (6) Les rapports 20/1 et 80/1 sont les rapports des concentrations en poids des 2 ADN.

(7) L'activité transformante de l'ADN traité a été testée pour 1 µg d'ADN/ml de milieu de trans-
formation.

Figures 11 et 12

POUVOIR COMPETITIF D'ADN D'HEMOPHILE TRAITE PAR ULTRA-SONS.

ADN transformant = ADN E 465

ADN compétiteur = ADN SKN 564 (o) traité par ultra-sons (voir conditions sous figure 1.) pendant:

| | |
|---|---|
| 15" | □ |
| 3o" | ▽ |
| 1'3o" | △ |
| 3' | ■ |
| 4'3o" | ▲ |
| 6' | ▼ |
| 1o' | ● |

Tests de transformation : ADN E : 1µg/ml de milieu de transformation

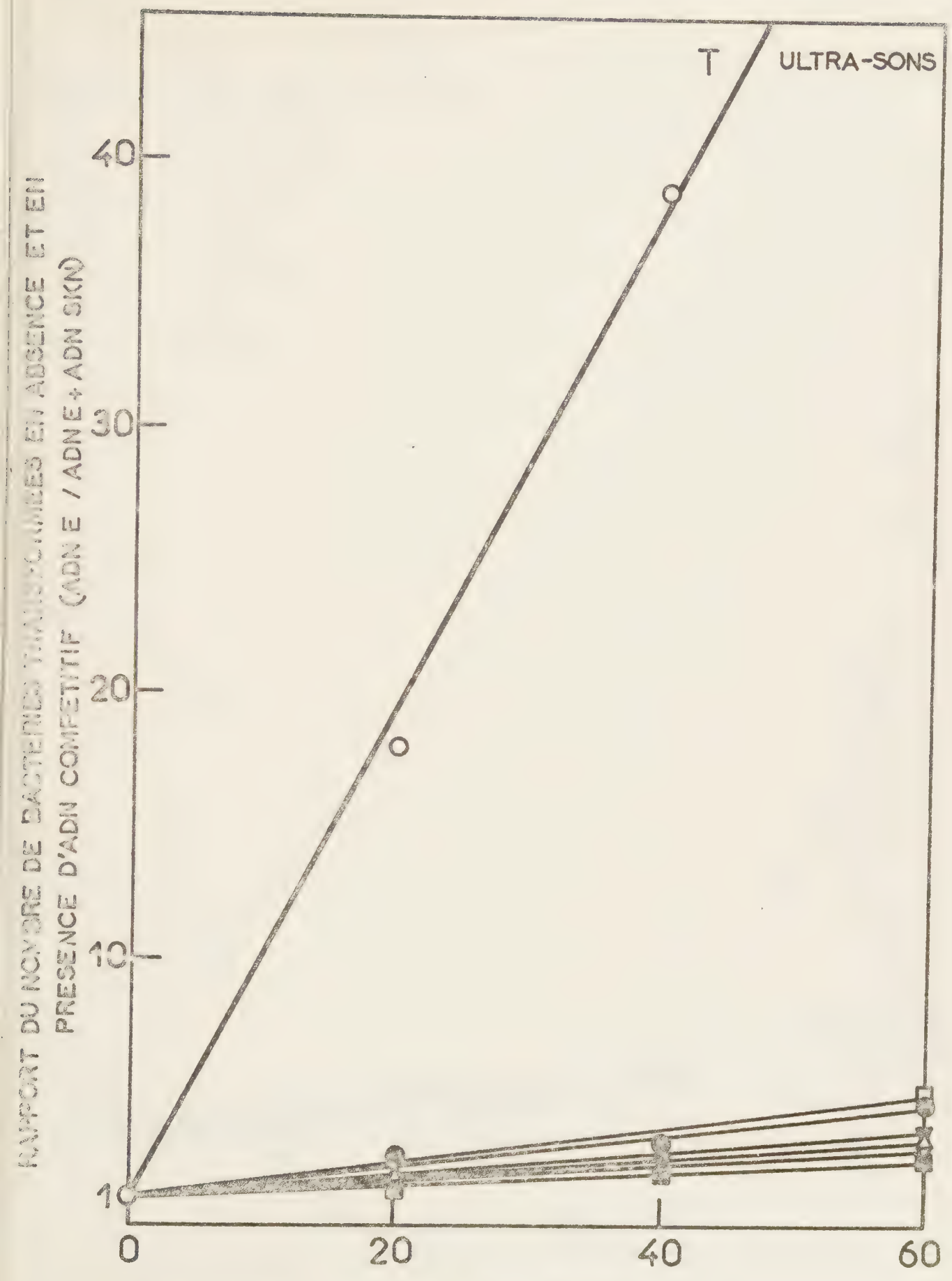
ADN SKN :

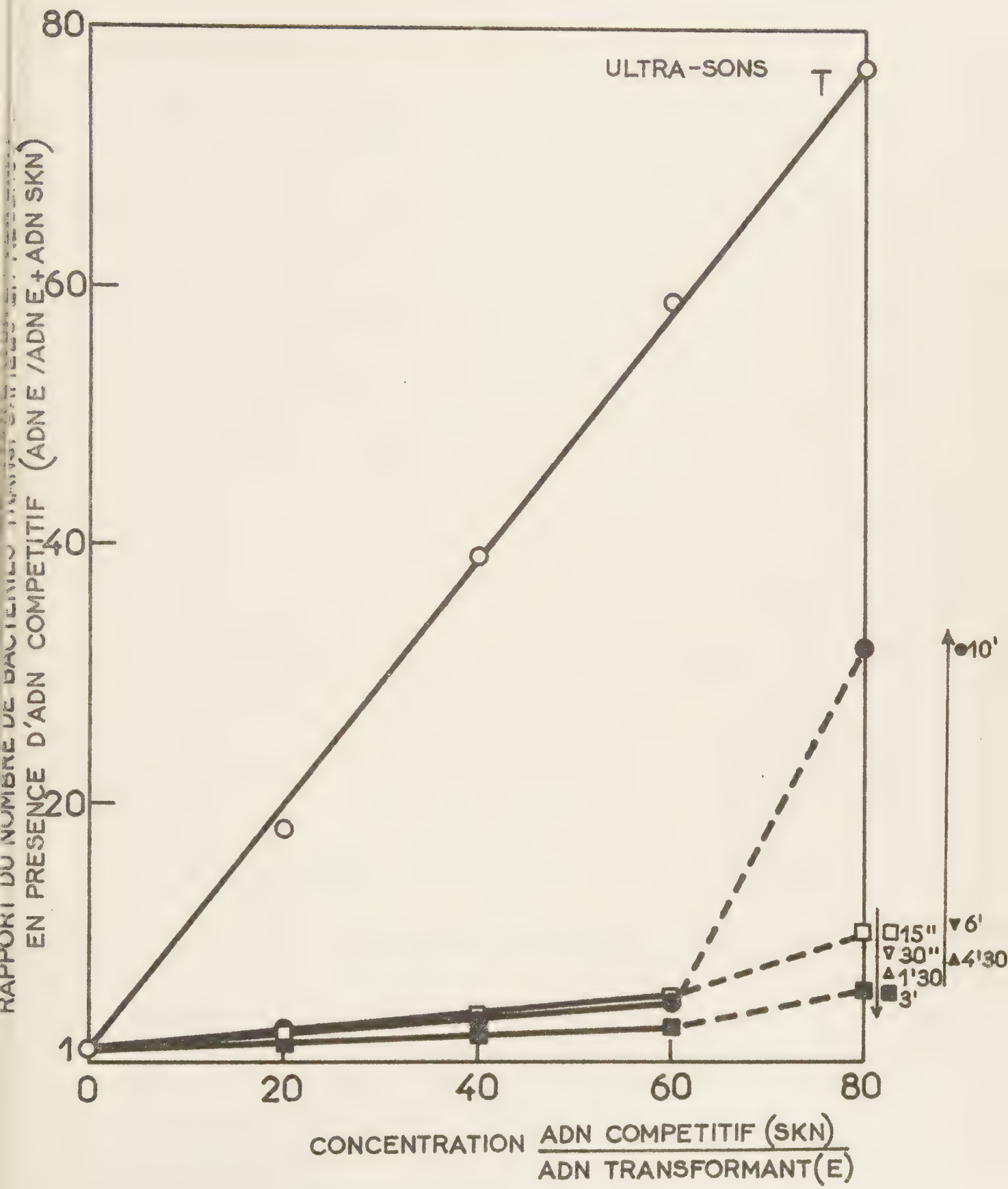
soit 2oµg/ml " "
4oµg/ml " "
6oµg/ml " "
8oµg/ml " "

Sélection des bactéries transformées sur milieu contenant de l'erythromycine (E)

Les droites sont une interprétation (selon LINEWAEVER H. et BURK D.,1934) du pouvoir inhibiteur de l'ADN SKN à la transformation par l'ADN E.

Les droites en traits discontinus représentent la variation du pouvoir compétitif de l'ADN SKN lorsque sa concentration dans le milieu passe de 6oµg à 8oµg/ml.


T
ULTRA-SONS
40
30
20
10
1
0
20
40
60
RAPPORT DU NOMBRE DE BACTERIES TRANSFORMEES EN ABSENCE ET EN PRESENCE D'ADN COMPETITIF (ADN E / ADN E + ADN SKN)
CONCENTRATION ADN COMPETITIF (SKN) / ADN TRANSFORMANT (E)


ULTRA-SONS
T
10'
6'
4'30
15"
30"
1'30
3'
RAPPORT DU NOMBRE DE BACTERIES TRANSFORMEES EN PRESENCE D'ADN COMPETITIF (ADN E /ADN E+ADN SKN)
CONCENTRATION ADN COMPETITIF (SKN) / ADN TRANSFORMANT (E)
0
20
40
60
80
1
20
40
60
80

teur (concentrations 8o/l) son pouvoir inhibiteur paraît être supérieur, surtout si sa dégradation préalable par ultra-sons a été très poussée. Nous avons attribué ce dernier résultat à un effet de densité de molécules d'ADN compétiteur dans le milieu transformant, donnant lieu à un empêchement stérique de la fixation des molécules d'ADN transformant sur les bactéries. En effet on peut calculer le pouvoir compétitif spécifique de l'ADN (qui est alors exprimé par molécule d'ADN au lieu d'être exprimé par rapport à la concentration en poids de l'ADN); il est inférieur au pouvoir compétitif observé expérimentalement :

Pouvoir compétitif spécifique de l'ADN x $10^3$

| ADN SKN / ADN E | ADN témoin | ADN traité (secondes) | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 15 | 3o | 9o | 18o | 27o | 36o | 6oo |
| 2o/l | 1 | 8,4 | 4,1 | 2,4 | 1,7 | 1,5 | 2,o | 1,5 |
| 8o/l | 1 | 8,3 | 4,6 | 2,3 | 1,4 | 2,o | 2,5 | 4,6 |

Pouvoir compétitif spécifique :

$$= \frac{\text{Pouvoir compétitif de l'ADN}}{\text{nombre de ruptures + 1}} \quad \begin{matrix}(\text{col.5/6 t.II} \\ \text{col.4} \quad \text{"} )\end{matrix}$$

Si nous comparons l'effet des ultra-sons sur le pouvoir compétitif et sur le pouvoir transformant de l'ADN (tableau II) nous constatons qu'après 15 secondes de traitement la capacité de fixation de l'ADN ($M_w$=1,44.$10^6$, de l'ordre de la masse critique) sur les bactéries est beaucoup plus modifiée que son pouvoir transformant. Après 3o secondes de trai-

tement, le pouvoir compétitif et le pouvoir transformant ont subi la même diminution ; c'est l'étape de dégradation de l'ADN à laquelle les cinétiques de dépolymérisation et d'inactivation se coupent : le pouvoir transformant diminue rapidement par la suite, alors que le pouvoir compétitif subit des variations beaucoup moins importantes.

L'importance de la chute de pouvoir compétitif de l'ADN au cours des 15 premières secondes de traitement est encore mieux mise en évidence si nous considérons le pouvoir compétitif spécifique de l'ADN.

Ainsi l'étude des variations du pouvoir compétitif de l'ADN traité par ultra-sons fait apparaître qu'elles sont en relation assez étroites avec la chute de masse corrélative de l'ADN : tableau II voir colonnes 3 et 5. L'étude du pouvoir compétitif d'ADN traité par DNAse confirmera ce point.

# CONCLUSIONS

L'étude que nous avons faite en vue de préciser le mécanisme de l'inactivation biologique de l'ADN par les ultra-sons nous amène à proposer, dans l'état actuel de nos connaissances, un modèle de dégradation qui tient compte des phénomènes auxquels est soumis l'ADN lorsqu'il est traité par ultra-sons au dessus du seuil de cavitation.

La dégradation de l'ADN d'Hémophile par ultra-sons donne lieu 1° à une chute de masse

2° à une chute de pouvoir transformant et de pouvoir compétitif de l'ADN

Lorsque la dégradation a lieu en présence d'AET l'activité transformante de l'ADN est partiellement protégée, alors que la dépolymérisation de l'ADN n'est pas modifiée.

La chute de masse a lieu selon une cinétique qui n'est pas continue en fonction de la durée d'action des ultra-sons. Après une première cinétique très rapide, la masse tend vers un palier de masse $M_w = o,44.1o^6$ daltons; celui-ci est suivi d'une deuxième chute de masse beaucoup plus lente. R.LITZLER (1967) a attribué les deux phases de dépolymérisation de l'ADN à 2 mécanismes successifs : 1)des ruptures de la double hélice d'ADN et 2)des ruptures sur l'un ou l'autre brin de la double hélice d'ADN, consécutifs à une série de réactions initiées par les radicaux qui se forment dans les solutions irradiées.

1) Dans les premiers temps de la dépolymérisation par ultra-sons les ruptures dépolymérisantes seraient introduites dans les molécules d'ADN de grande taille, plus sensi-

bles aux effets de tension créés par les ultra-sons dans la solution; l'effet mécanique de rupture serait par conséquent très important dans les premiers instants d'émission d'ondes ultra-sonores; il s'atténuerait ensuite progressivement en fonction de la diminution de la taille des molécules. Selon R.LITZLER ceci s'expliquerait par le fait que les ruptures ont lieu en des points spécifiques de l'ADN présents en nombre restreint.

2) La deuxième cinétique de dépolymérisation de l'ADN serait dûe à une accumulation de ruptures monocaténaires dans la double hélice d'ADN, et la fin du temps de latence de ce mécanisme de dépolymérisation se situerait à la fin du palier de masse (R.LITZLER 1967). Selon C.SADRON et R. LITZLER, les radicaux libres qui se forment au cours de l'irradiation, induiraient la formation de peroxydes organiques; ceux-ci seraient responsables de la deuxième chute de masse de l'ADN : ils agiraient sur les segments d'ADN produits au cours de la première cinétique. Cette deuxième cinétique n'aurait lieu immédiatement que si l'on opère sous oxygène; sous air elle commencerait vers la fin de la première cinétique ( c'est-à-dire à l'approche du plateau de masse); elle est fonction de la quantité d'oxygène dans le milieu irradié. Ces interprétations sont fondées en partie sur des résultats de dénaturation alcaline de l'ADN traité par ultra-sons (LITZLER 1967).

Nous avons vu que la valeur de masse de l'ADN doit être un paramètre important pour le maintien de son pouvoir compétitif, c'est-à-dire de son adsorption sur les sites récepteurs des bactéries. Ceci est exprimé tant par les résultats de tests de compétition que nous avons effectués (tableau II) que par les différences observées, dans les tests de trans-

formation, entre les résultats obtenus à concentration saturante et à concentration non saturante d'ADN (fig.2 et fig. 9 et 1o). Nous avons vu que lorsque les conditions de transformation le permettent (concentration saturante en ADN), les bactéries choisissent les molécules d'ADN les plus longues parmi celles qui sont mises en leur présence.
Une valeur de masse particulièrement critique pour la transformation, de l'ordre de 1 à $2.1o^6$ daltons est mise en évidence par la figure 6.
Il apparaît d'après toutes nos données que le critère de masse interviendrait surtout au moment de la fixation de l'ADN sur les bactéries et serait donc essentiel dans la première étape de la transformation.

La chute de pouvoir transformant de l'ADN en fonction du temps suit une cinétique à 2 phases: dans la première phase, qui dure jusqu'à 3o" de traitement dans nos conditions expérimentales ( la masse $M_w$ de l'ADN a alors atteint o,9.$1o^6$ daltons), la perte d'activité transformante est proche de l'exponentielle; ultérieurement elle devient fonction de $t^2$.

L'inactivation et la séparation des marqueurs de l'ADN ont pu être précisées pendant la première cinétique. La sensibilité des marqueurs S et K au traitement par ultra-sons est de même ordre et égale à 1,26 par rapport à celle du marqueur N. Les lésions touchant les marqueurs proches S et K ont un effet partiel de chevauchement sur ces marqueurs: 1 lésion sur 2 inactive simultanément S et K. En ce qui concerne la séparation éventuelle des marqueurs plus éloignés S et N par les ruptures d'ultra-sons, nous n'avons pu la mettre en évidence; nos résultats sont en faveur d'un effet additif des lésions introduites dans ces 2 marqueurs.

Nous avons également évalué la taille de la cible que constituent les marqueurs S et N lorsque les ultra-sons sont employés comme agent inactivant. N présente alors une taille de $o,6.1o^6$ daltons et S est égal à $o,75.1o^6$ daltons. Si nous comparons ces résultats à ceux de J.H.STUY pour les mêmes marqueurs[x], nous pouvons considérer qu'une lésion inactive le marqueur qu'elle touche; une rupture dépolymérisante dûe à l'action des ultra-sons ne semble donc pas avoir un effet inactivant à très longue distance. L'effet de chevauchement observé pour les marqueurs S et K sera discuté dans les conclusions générales de ce travail.

La majorité de nos données expérimentales concernent toutefois la deuxième cinétique, et leur interprétation est par conséquent assez malaisée..
Les radicaux libres qui se forment dans les solutions irradiées, semblent alors participer d'une manière appréciable à l'inactivation : la présence d'AET dans le milieu irradié protège partiellement l'ADN des phénomènes inactivants qu'il subit. Nos données (tableau I) sont en accord avec celles de R.LITZLER qui ont trait à la deuxième cinétique de dépolymérisation de l'ADN; l'effet protecteur de l'AET et les ruptures monocaténaires n'apparaissent tous deux, dans nos conditions opératoires, qu'après un certain temps d'action des ultra-sons; ils augmentent ensuite au cours de la dégradation qui se poursuit pendant le palier de masse (voir également B.J.BARNHART et R.M.HERRIOTT 1963).
Aux mêmes stades de dégradation la présence d'AET,par contre, ne modifie pas sensiblement les valeurs de masse de l'ADN (tableau I); les lésions de l'ADN dûes à l'action des radicaux manifestent donc probablement leur effet inactivant lors de l'intégration de l'ADN dans le génome bacté-

rien.

---

x J.H.STUY (thèse 1961) a estimé la taille de la cible constituée par chacun de ces marqueurs, d'après des données d'inactivation par des radiations ionisantes et par la DNAse pancréatique, il en a déduit la taille intrinsèque de chaque marqueur.
La cible sensible à l'inactivation serait égale à $o,5.1o^6$ daltons pour le marqueur N et à $o,82.1o^6$ daltons pour S et pour K, qui auraient la même taille. La taille de ces marqueurs serait respectivement de $o,16.1o^6$ et de $o,48.1o^6$ daltons : une région nucléotidique de o,17 daltons constituerait de part et d'autre des marqueurs une région sensible dans laquelle l'introduction d'une lésion inactiverait le marqueur adjacent.

---

Trois facteurs ont ainsi pu être précisés, qui interviennent dans l'inactivation de l'ADN :

1°) La chute de masse de l'ADN, à laquelle le pouvoir de pénétration de l'ADN dans les bactéries paraît être particulièrement sensible.
Par ailleurs une masse de 1 à $2.1o^6$ daltons semble être nécessaire à l'expression de l'activité transformante de l'ADN.

2°) Le nombre de ruptures de la double hélice d'ADN, auquel nous avons attribué une importance particulière au cours de la première cinétique d'inactivation. La figure 13 confirme l'importance de ce facteur inactivant. Elle montre que la cinétique d'inactivation est exponentielle en fonctions du nombre de ruptures introduites dans l'ADN, jusqu'à une durée de traitement par ultra-sons de 1 minute.
Cette cinétique toutefois n'est pas une cinétique à un coup: l'origine de la droite, dans la représentation de la figure 13, se situe à une ordonnée supérieure à la valeur 1oo ; les premières ruptures dépolymérisantes ne sont donc pas inactivantes. Ce fait est également exprimé dans la figure 5 (Acti-

vité transformante/$M_w$) Dans les représentations de l'inactivation de l'ADN en fonction de la durée de traitement (fig.4, 7,9) l'extrapolation des premiers points expérimentaux indique déjà un léger épaulement dans la première phase de l'inactivation.

3°) Les radicaux libres formés dans la solution irradiée en présence d'oxygène, et dont l'effet inactivant viendrait s'ajouter à celui des ruptures, essentiellement au cours de la deuxième cinétique d'inactivation. Nous avons vu que leur effet commence à se manifester à 1 minute de traitement. C'est à partir de ce moment que l'inactivation de l'ADN devient plus importante en regard d'un même nombre de ruptures (fig.13)

L'étude de l'inactivation de l'ADN par les ultra-sons, en présence d'AET, aurait dû nous permettre de mieux comprendre l'importance de l'action des radicaux libres dans les deux phénomènes que sont l'inactivation et la dépolymérisation de l'ADN par les ultra-sons. Elle aurait pu en particulier confirmer ou infirmer la validité de l'interprétation donnée à ce sujet par R.LITZLER ; selon cette interprétation la présence d'AET devrait en effet empêcher que la deuxième cinétique de dépolymérisation ait lieu à la suite de la première.

Le problème de la taille critique des molécules devrait, par contre, pouvoir être résolu par une étude de la relation entre activité transformante de l'ADN et longueur de ses molécules. Cette étude pourrait se faire sur des préparations d'ADN dont les molécules ont été fractionnées selon leur taille. Une première étude dans ce sens a été entreprise par A.NICOLAIEFF et A.GOUCHET (en préparation) qui ont fait appel au microscope électronique pour évaluer le nombre et la tail-

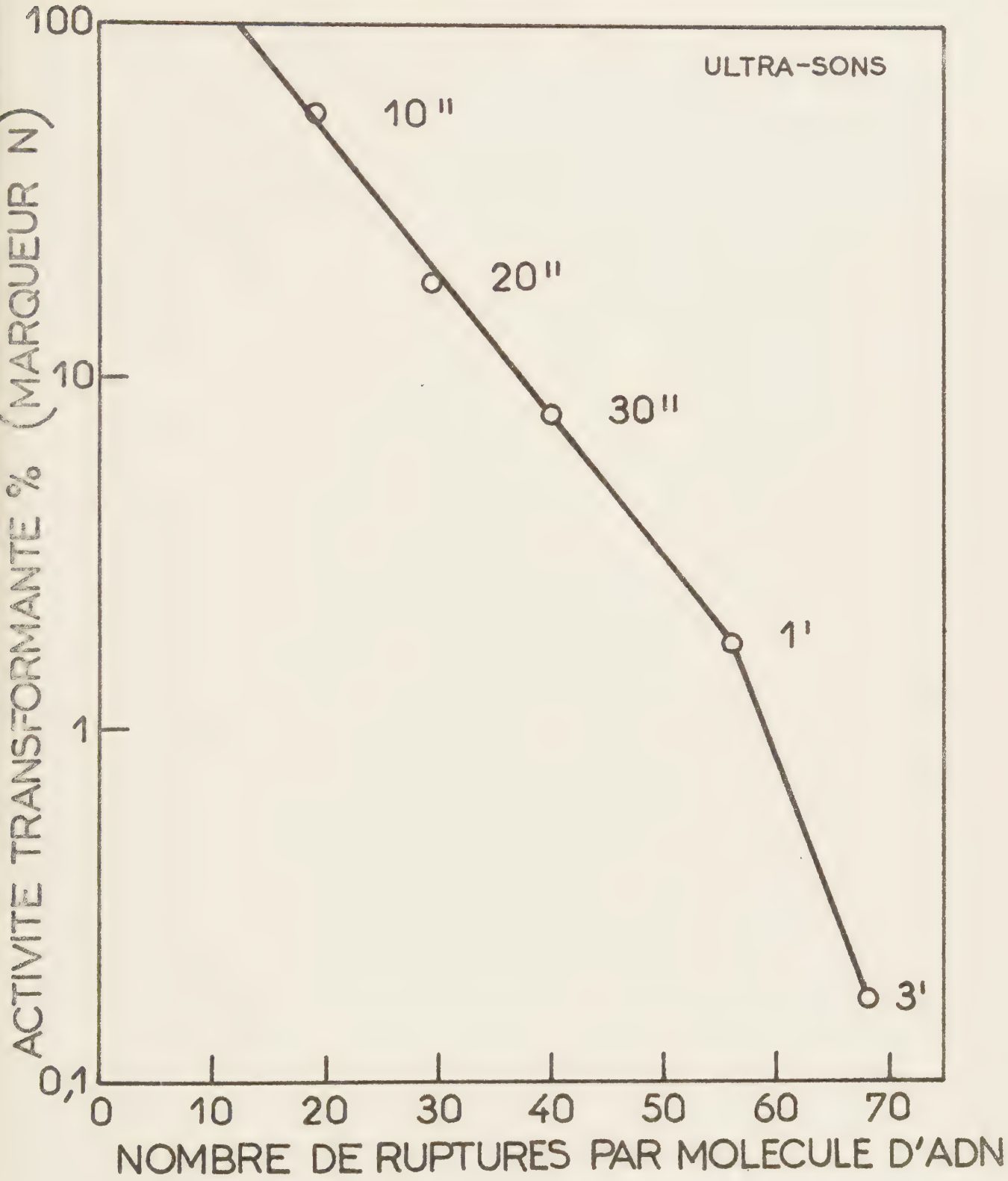
Figure 13

INACTIVATION DU MARQUEUR N DE L'HEMOPHILE EN FONCTION DU NOMBRE DE RUPTURES DEPOLYMERISANTES INTRODUITES DANS LA MOLECULE D'ADN

Conditions d'action des ultra-sons : voir figure 1.

Le nombre de ruptures a été calculé selon A.CHARLESBY (1954) compte tenu de la variation de polydispersité de l'ADN au cours du traitement (LITZLER 1967).

Transformation bactérienne à saturation d'ADN (1µg/ml). Des résultats analogues sont obtenus pour le marqueur S ; seule la pente des cinétiques est différente ; l'ordonnée à l'origine est également égale à 3.


ULTRA-SONS
10"
20"
30"
1'
3'
100
10
1
0,1
ACTIVITE TRANSFORMANTE % (MARQUEUR N)
0
10
20
30
40
50
60
70
NOMBRE DE RUPTURES PAR MOLECULE D'ADN

le des molécules d'une préparation d'ADN après différents temps de traitement par ultra-sons; les résultats actuellement acquis sont en faveur de l'existence d'une limite de taille inférieure au dessous de laquelle il n'y aurait plus de pouvoir transformant.

## 3ème PARTIE

# ACTION DE LA DNAse ACIDE SUR L'ADN D'HEMOPHILE

≠ Introduction

≠ Dépolymérisation et inactivation de l'ADN. Comparaison avec les effets de la DNAse pancréatique

≠ Sensibilité des différents marqueurs liés de l'Hemophile à l'action inactivante de la DNAse acide et de la DNAse pancréatique. Effet de leur action sur la liaison des marqueurs

≠ Analyse de l'effet inactivant de la DNAse acide :

- Tests de compétition
- Inactivation par la DNAse de Coli
- Posttraitement par phosphatase

≠ Conclusions

# INTRODUCTION

Les DNAses produisent sur l'ADN des ruptures des liaisons phosphodiesters ; à ces ruptures ne s'ajoute aucune autre action ; en particulier ces enzymes n'agissent pas sur les bases de l'ADN. C'est pour ces raisons que nous avons choisi ces agents lorsque nous nous sommes proposé d'étudier l'effet de coupures de molécules d'ADN sur leurs propriétés biologiques.

Notre travail est consacré à l'étude de l'action de la DNase sur l'ADN transformant de l'Hemophile. Deux autres DNAses ont été utilisées dans ce même travail, en vue de comparer leurs effets sur l'ADN à ceux de la DNAse acide ; ce sont la DNAse pancréatique et la DNAse de Coli.

---

Nos connaissances actuelles sur la DNAse acide sont dûes essentiellement aux travaux de G.BERNARDI et de ses collaborateurs. G.BERNARDI et C.SADRON (1961, 1964 a et b) ont mis en évidence une double action de la DNAse acide sur les molécules d'ADN natif :- la DNAse acide coupe simultanément et au même niveau les deux brins de la double hélice d'ADN ; cette cinétique d'action "à 1 coup" provoque une diminution immédiate de la masse de l'ADN. - Par ailleurs la DNAse acide produit des scissions d'un seul des brins de l'ADN ; cette cinétique de dégradation est à 2 coups. Ces deux cinétiques sont donc dûes respectivement 1) à un mécanisme

que nous appellerons diplotomique, par lequel la DNAse produit des doubles ruptures de l'ADN et 2) à un mécanisme haplotomique ou mécanisme de ruptures simples.

La structure et les propriétés de la DNAse acide ont été étudiées sur des préparations enzymatiques très pures, dont G.BERNARDI et coll. (G.BERNARDI et M.GRIFFE 1964);(G. BERNARDI, A.BERNARDI et A.CHERSI 1966) donnent le mode de préparation à partir de la rate de porc.
Les propriétés physiques de l'enzyme sont analysées par G. BERNARDI, A.APPELLA et R.ZITO 1964.
G.BERNARDI (1965) montre que cet enzyme est une protéine dimérique ayant des propriétés de symétrie et d'allostérie. Cette protéine a une masse de 38.000 ; sa composition en amino-acide a été analysée et il a été démontré qu'elle est formée de deux sous-unités. Elle forme un complexe de type coopératif avec un substrat synthétique : le bis(p-nitrophenyl)phosphate.
La DNAse est inhibée compétitivement par certains ARN de transfert et par certains polyribonucléotides de synthèse.

Parmi les caractéristiques d'action de la DNAse acide nous en noterons deux qui sont fondamentales dans le cadre de ce travail :
1°) la DNAse manifeste son activité optimale à pH5 en milieu de force ionique o,15, ou à pH7 lorsque $\mu$=o,o1.
2°)l'enzyme dégrade l'ADN natif en oligonucléotides de grande taille (M.CARRARA et G.BERNARDI, en préparation) portant des nucléosides terminaux 3'P (J.F.KOERNER et R.L.SINSHEIMER 1957).

L'ADN soumis à l'action de la DNAse acide est coupé en fragments qui, jusqu'à une masse de loo.ooo, gardent une structure secondaire intacte (L.A.McHATTIE, G.BERNARDI,C.A.

THOMAS Jr. 1963) ; toutes les propriétés physico-chimiques de l'ADN sont conservées (G.BERNARDI et C.SADRON 1964a)

Il a été suggéré que la DNAse acide, par le fait de son mécanisme d'action diplotomique pourrait jouer un rôle biologique important ; elle pourrait intervenir dans les mécanismes de recombinaison génétique entre deux molécules d'ADN. En effet la DNAse acide a été trouvée dans toutes les cellules des organismes eucaryotes où elle a été recherchée ; de plus le taux de cet enzyme, qui varie selon les cellules, est le plus élevé dans les cellules des tissus en voie de division intense (V.ALLFREY et A.E.MIRSKY 1952 ; C.CORDONNIER et G.BERNARDI 1965)
Deux DNAses ayant un mécanisme d'action similaire de celui de la DNAse acide ont été trouvé jusqu'àlors dans les bactéries ; ce sont les DNAses de E.Coli et de Pneumocoque.

La DNAse de Coli (= endonucléase I de Lehman : I.R. LEHMAN et Coll.1962) dégrade donc l'ADN comme la DNAse acide, par les deux mécanismes diplo-et haplotomique (G.BERNARDI et C.CORDONNIER 1965), mais forme, comme la DNAse pancréatique, des oligonucléotides terminés par un nucléoside 5'P. Cet enzyme est extrait et purifié selon C.CORDONNIER et G.BERNARDI (1966 et manuscrit en préparation).

La DNAse pancréatique,par contre, agit sur l'ADN seulement par un mécanisme haplotomique et dégrade l'ADN en oligonucléotides 5'P (R.L.SINSHEIMER et J.F.KOERNER 1951). La dépolymérisation de l'ADN par cet enzyme ne devient par conséquent effective qu'après un temps de latence , et il faut 2oo ruptures environ pour diminuer de moitié la masse moyenne d'une préparation d'ADN de 6,1o$^6$ daltons ; deux ruptures haplotomiques , situées chacune sur un brin différent de l'ADN, donnent lieu à une coupure de la molécule lorsqu'elles sont

séparées par 6 ou moins de 6 nucléotides (C.A.THOMAS Jr.1956 V.N.SCHUMACKER, E.G.RICHARDS et H.K.SCHACHMAN 1956).

L'effet d'un traitement par la DNAse acide sur les propriétés transformantes d'un ADN n'était pas connu lorsque nous avons commencé ce travail. Nos résultats apportent les premières données à ce sujet.
Il en est de même pour la DNAse de Coli.

Par contre de nombreux auteurs avaient étudié les conséquences de l'action de la DNAse pancréatique sur l'activité transformante de l'ADN d'Hemophile (S.ZAMENHOF, H.E. ALEXANDER et G.LEIDY 1953 ; J.H.STUY 1961 ; S.H.GOODGAL 1961), de Pneumocoque (L.S.LERMAN et L.J.TOLMACH 1957) et de B.Subtilis (W.BODMER 1966). S.ZAMENHOF et Coll. montrent que l'activité transformante de l'ADN d'Hemophile diminue dès la mise en contact de l'ADN avec cette DNAse et décroit donc déjà pendant le temps de latence de dépolymérisation. L.S. LERMAN et Coll. constatent que la pénétration de l'ADN dans les bactéries est moins inhibée par ces lésions que ne l'est l'activité transformante de l'ADN. Selon W.BODMER le pouvoir transformant de l'ADN serait beaucoup plus inhibé que son intégration dans le génome bactérien récepteur. J.H.STUY et S.H.GOODGAL ont, tous deux, étudié l'inactivation des marqueurs S et N de l'Hemophile ; alors que J.H.STUY affirme avoir séparé ces deux marqueurs par action de la DNAse pancréatique, S.H.GOODGAL publie des résultats qui sont en contradiction. Comme S.H.GOODGAL, W.BODMER trouve que l'inactivation de différents marqueurs liés de B.Subtilis est additive. Dans son travail W.BODMER note qu'il n'y a pas de différence significative entre les résultats d'inactivation de l'ADN de B.Subtilis par les trois enzymes précités lorsque l'inactivation est étudiée en fonction de la chute de visco-

sité de l'ADN.

Le seul travail qui compare l'effet de la DNAse acide et de la DNAse pancréatique sur les propriétés biologiques d'un ADN a été effectué par E.T.YOUNG et R.L.SINSHEIMER (1965); ces auteurs concluent qu'une seule rupture de type diplotomique (par DNAse acide)suffit à enlever son pouvoir infectieux à une molécule d'ADN de Phage ; par contre, alors que chaque lésion de DNAse pancréatique peut être également inactivante pour le même ADN, il faut 4 ruptures haplotomiques par molécule pour détruire son infectivité.

---

Nous avons abordé l'étude de la dégradation de l'ADN d'Hemophile par la DNAse acide, en vue de préciser l'effet d'une part des doubles ruptures et d'autre part des nucléosides 3'P terminaux sur l'activité transformante de l'ADN. Nous avons examiné ce problème sous différents aspects, et les résultats expérimentaux que nous avons obtenus seront décrits dans les chapitres suivants :

1. Dépolymérisation et inactivation de l'ADN d'Hemophile par la DNAse acide, et comparaison de ces effets à ceux de la DNAse pancréatique. Cinétiques et Interprétations. La DNAse pancréatique a été choisie comme enzyme de référence, tant en raison des nombreux travaux qui ont été faits à son sujet, que comme élément de comparaison dans ce travail,sachant que cette DNAse ne réalise que des ruptures d'un brin de l'ADN.

2. Sensibilité des différents marqueurs de l'Hemophile à l'action des deux DNAses : DNAse acide et DNAse

pancréatique. Effet de leur action sur la liaison des marqueurs.

3.- Analyse de l'effet inactivant de la DNAse acide

A) par des tests de compétition, en vue de connaître l'étape de la transformation qui est inhibée par les lésions extrêmement inactivantes de la DNAse acide.

B) par l'étude de l'inactivation de l'ADN par la DNAse de Coli qui permet de préciser si la nature des groupes 3'P ou 5'P à l'intérieur ou à l'extrémité de chaînesd'ADN a une influence sur l'activité transformante de ces molécules d'ADN.

C) par action de phosphatase sur l'ADN préalablement traité par la DNAse acide ; la variation du pouvoir transformant de l'ADN à la suite de chacun de ces traitements donne des renseignements supplémentaires sur le mécanisme d'inhibition à la transformation par les nucléosides 3'P terminaux, présents dans la chaîne d'ADN.

Nous avons étudié l'inactivation des marqueurs génétiques en fonction de la diminution de masse de l'ADN d'Hemophile. Cette étude aurait dû être faite, en réalité, par comparaison de la perte d'activité transformante de l'ADN au nombre de ruptures produites parallèlement par la DNAse acide. Cependant, la titration de très petits nombres de groupes acides libérés en milieu de pH5 est trop imprécise. L'évaluation du nombre de ruptures a donc été faite à partir de la chute de viscosité de l'ADN au cours des traitements enzymatiques.

# DEPOLYMERISATION ET INACTIVATION DE L'ADN D'HEMOPHILE PAR LA DNAse ACIDE
# COMPARAISON AVEC LES EFFETS DE LA DNAse PANCREATIQUE

## A.- Dépolymérisation de l'ADN d'Hemophile

La dépolymérisation de l'ADN d'Hemophile par les différentes actions enzymatiques a été déterminée par des mesures de viscosité (voir Méthodes expérimentales)
La représentation des cinétiques de dépolymérisation sous forme $M_o/M_t$ en fonction du temps, qui donne des droites à partir des cinétiques obtenues, a été utilisée dans la figure 1. Cette figure permet de comparer la dégradation de l'ADN par la DNAse acide à pH5, par la même DNAse à pH6,7 et par la DNAse pancréatique.
Elle met en évidence un temps de latence avant que n'ait lieu réellement la dépolymérisation de l'ADN par la DNAse pancréatique. Ce temps de latence n'est retrouvé, pour la DNAse acide, dans aucune des conditions opératoires utilisées : la dépolymérisation de l'ADN par la DNAse acide est immédiate dès sa mise en contact de DNAse.
Elle montre également que les cinétiques d'action de la DNAse acide (en fonction du temps), sont très différentes selon les conditions opératoires d'action ; elles sont plus lentes à pH 6,7, d'autant plus qu'à ce pH la concentration en enzyme est 35 fois supérieure à celle utilisée à pH5 pour la même concentration en ADN.

Ces données concernent les premiers stades seulement de la

dégradation enzymatique ; un domaine restreint de chute de masse nous était imposé par l'étude ultérieure que nous avons entreprise sur les échantillons d'ADN dégradés ; les diminutions d'activité transformante de l'ADN deviennent rapidement très importantes et sortent alors de nos domaines d'estimation.

Les mêmes données expérimentales ont été utilisées dans la figure 2 en vue de préciser les types d'action enzymatique auxquels a été soumis l'ADN d'Hemophile. La pente des droites qu'on obtient dans la représentation de V.N.SCHUMACKER, E.G. RICHARDS et H.K.SCHACHMAN (1956), à partir des cinétiques précédentes donne le nombre apparent de brins de l'ADN à l'égard de l'action dépolymérisante des deux DNAses.
La pente des droites qui résultent de la cinétique de dégradation par la DNAse acide est proche de l'unité, quelques soient les conditions de son action. La dépolymérisation de l'ADN semble être celle d'un polymère à une chaîne. Lorsque l'ADN est dégradé par la DNAse pancréatique il se comporte comme un polymère à deux chaînes.

Cette représentation des résultats met donc en évidence que l'ADN d'Hemophile est dépolymérisé par la DNAse acide selon un mécanisme diplotomique et confirme ainsi les résultats qui avaient été précédemment établis à pH neutre et faible force ionique sur l'ADN d'erythrocyte de poulet (G.BERNARDI et C.SADRON 1964 b). Elle confirme également le mode d'action différent de la DNAse pancréatique, qui présente comme escompté, dans cette représentation, une pente voisine de 2, ce qui indique une dépolymérisation de l'ADN par un mécanisme haplotomique.
En conclusion,

les caractéristiques de l'action de la DNAse pan-

Figures 1 et 2

DEPOLYMERISATION DE L'ADN D'HEMOPHILE PAR LA DNAse ACIDE ET LA DNAse PANCREATIQUE

L'ADN d'Hemophile SKN 564 portant les 3 marqueurs de résistance S,K et N , $M_w = 12.10^6$ , est dégradé à raison de 50µg/ml de milieu réactionnel ;

Conditions d'action des deux DNAses:

DNAse acide pH 5 : 0,15mµg/ml en tampon acétate 0,15M pH 5 + versène 0,01M et cytochrome C 0,05%

DNAse acide pH6,7: 5,25mµg/ml en tampon phosphate 0,01M pH 6,7

DNAse pancréatique : 1,5mµg/ml en tampon phosphate 0,1M pH 6,8 + $MgCl_2$ 0,02M

La diminution de la masse de l'ADN est déterminée par des mesures de viscosité effectuées dans un viscosimètre type J.EIGNER(1960) à 4 boules. Nous avons calculé les valeurs de masse d'après les formules de J.EIGNER et P.DOTY (1965) en utilisant les valeurs de viscosité intrinsèque $[\eta]$ déterminées pour les solutions d'ADN à chaque temps de traitement Les conditions d'action des DNAses, l'obtention et l'exploitation des données expérimentales, sont décrites en détail dans le chapitre "Methodes expérimentales"

Graphique 1 : $M_o/M_t = f(t)$

$M_o$ = masse $M_w$ de l'ADN au temps o
$M_t$ = " " " " " t
t = durée du traitement

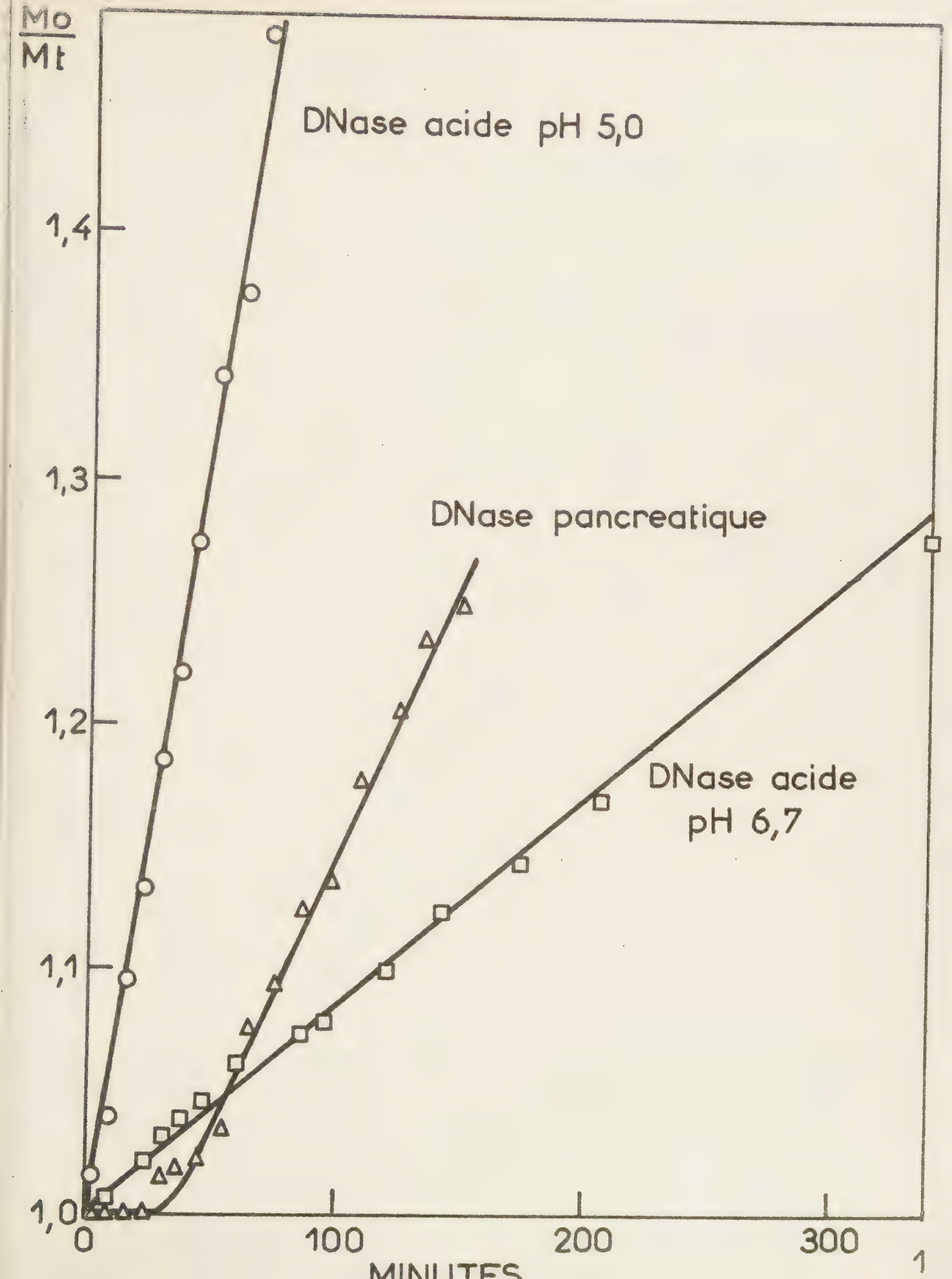
..../....

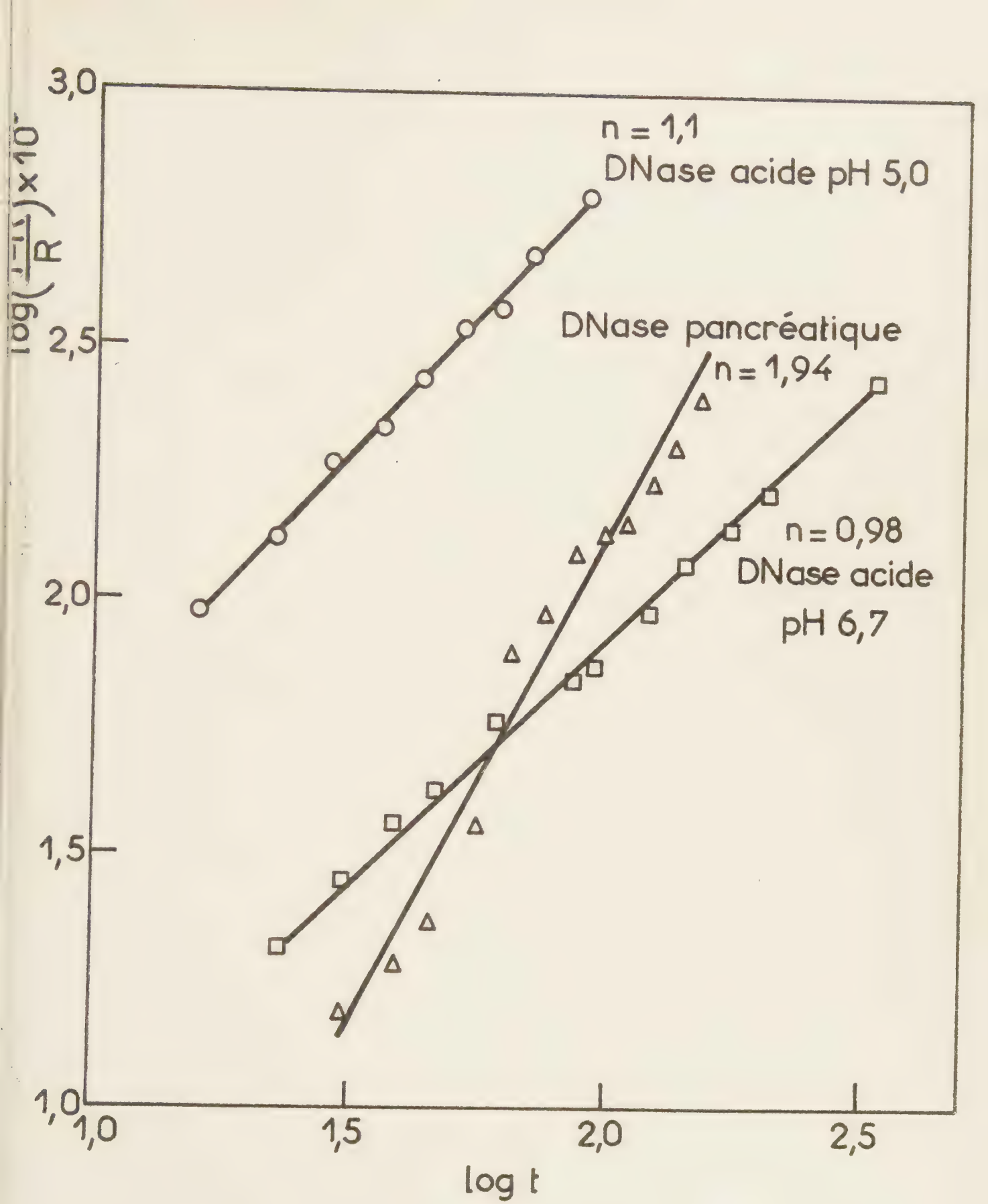
..../....

Graphique 2 : $\log \frac{1 - R}{R} = k(\log t)$

Rappelons que $R = M_t/M_o$

Dans cette représentation, selon L.F.CAVALIERI et B.H ROSENBERG (1961), le nombre de chaînes: n, de l'ADN, est égal à 1,1 (à pH 5) et 0,98 (à pH 7) lorsque l'ADN est traité par DNAse acide ; il est égal à 1,94 lorsque l'ADN est traité par DNAse pancréatique; par conséquent l'ADN est dépolymérisé, respectivement, comme un polymère à 1 et à 2 chaînes.


Mo/Mt
DNase acide pH 5,0
DNase pancreatique
DNase acide pH 6,7
1,4
1,3
1,2
1,1
1,0
0
100
200
300
MINUTES


3,0
2,5
2,0
1,5
1,0
1,0
1,5
2,0
2,5
log t
n = 1,1
DNase acide pH 5,0
DNase pancréatique
n = 1,94
n = 0,98
DNase acide
pH 6,7

créatique acceptées d'une manière générale, en particulier le temps de latence et la cinétique de dépolymérisation à 2 coups sont retrouvées dans nos résultats de dépolymérisation de l'ADN d'Hemophile par cet enzyme.

La cinétique à un coup, caractérisant selon les travaux de G.BERNARDI la dépolymérisation d'ADN par la DNAse acide, a été confirmée et établie pour l'ADN d'Hemophile aux deux optima d'action de la DNAse acide, c'est-à-dire à pH5 en force ionique o,15M et à pH neutre en faible force ionique.

Ces données physico-chimiques de la dégradation de l'ADN d'Hemophile étant précisées, elles nous ont servi de base pour l'interprétation de l'inactivation concommitante de son pouvoir transformant.

B.- Inactivation de l'ADN d'Hemophile par la DNAse acide

La diminution de pouvoir transformant de l'ADN d'Hémophile en fonction du temps d'action de la DNAse n'est pas exponentielle, quelque soit le marqueur étudié (fig.3) Un ralentissement de l'inactivation de l'ADN au cours du temps a été observé également par d'autres auteurs, dans l'étude de l'inactivation de l'ADN d'Hémophile (S.ZAMENHOF et Coll.1953, J.H.STUY thèse 1961) et de Pneumocoque (L.S. LERMAN et L.J.TOLMACH 1957) par la DNAse pancréatique; il a été interprété comme étant dû vraisemblablement à une inactivation progressive de l'enzyme.

La figure 3 présente la chute de viscosité et la perte de pouvoir transformant de l'ADN mis en présence de DNAse acide à pH5 (A) ou à pH6,7 (B) ou en présence de DNAse pancréatique (C).
La diminution de la viscosité spécifique est dans les trois cas très faible par rapport à la diminution du pouvoir transformant des marqueurs N et S. A un même stade de dépolymérisation, l'inactivation de ces marqueurs s'est révélée ne pas être la même selon la nature du traitement enzymatique. En vue d'une comparaison plus facile des trois séries de résultats, l'échelle des temps, dans la figure 3 . est différente pour chaque graphique et a été choisie de manière à donner des valeurs de viscosité comparables le long de l'axe des abscisses.

Figure 3

DEPOLYMERISATION ET INACTIVATION DE L'ADN D'HEMOPHILE PAR LA DNAse ACIDE ET PAR LA DNAse PANCREATIQUE

Chute de viscosité : $\eta$ sp/c ( □ , carrés), et perte d'activité transformante des marqueurs N (o, cercles) et S ( △ , traingles) de l'ADN SKN 564, au cours de traitement (conditions expérimentales : fig.1) par :

DNAse acide à pH 5 (A)
DNAse acide à pH 6,7 (B)
DNAse pancréatique (C)

Tests de transformation à saturation d'ADN (1µg/ml)

L'échelle des temps a été choisie de manière à présenter des chutes de viscosité comparables, dans les trois graphiques, en fonction de la distance sur l'axe des abscisses.

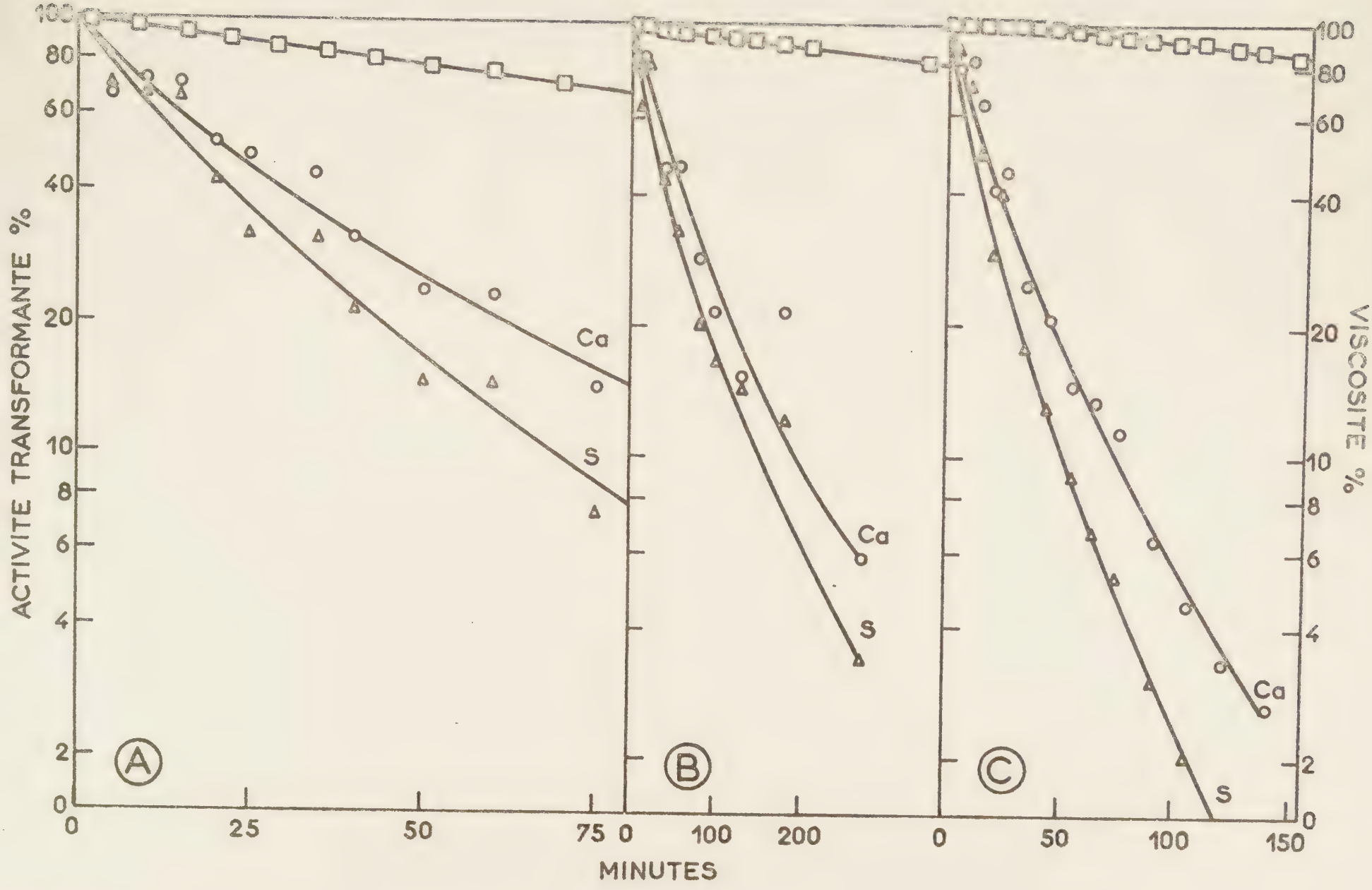

ACTIVITE TRANSFORMANTE %
VISCOSITE %
MINUTES
Ca
S
A
B
C
100
80
60
40
20
10
8
6
4
2
0
0
25
50
75
100
200
150

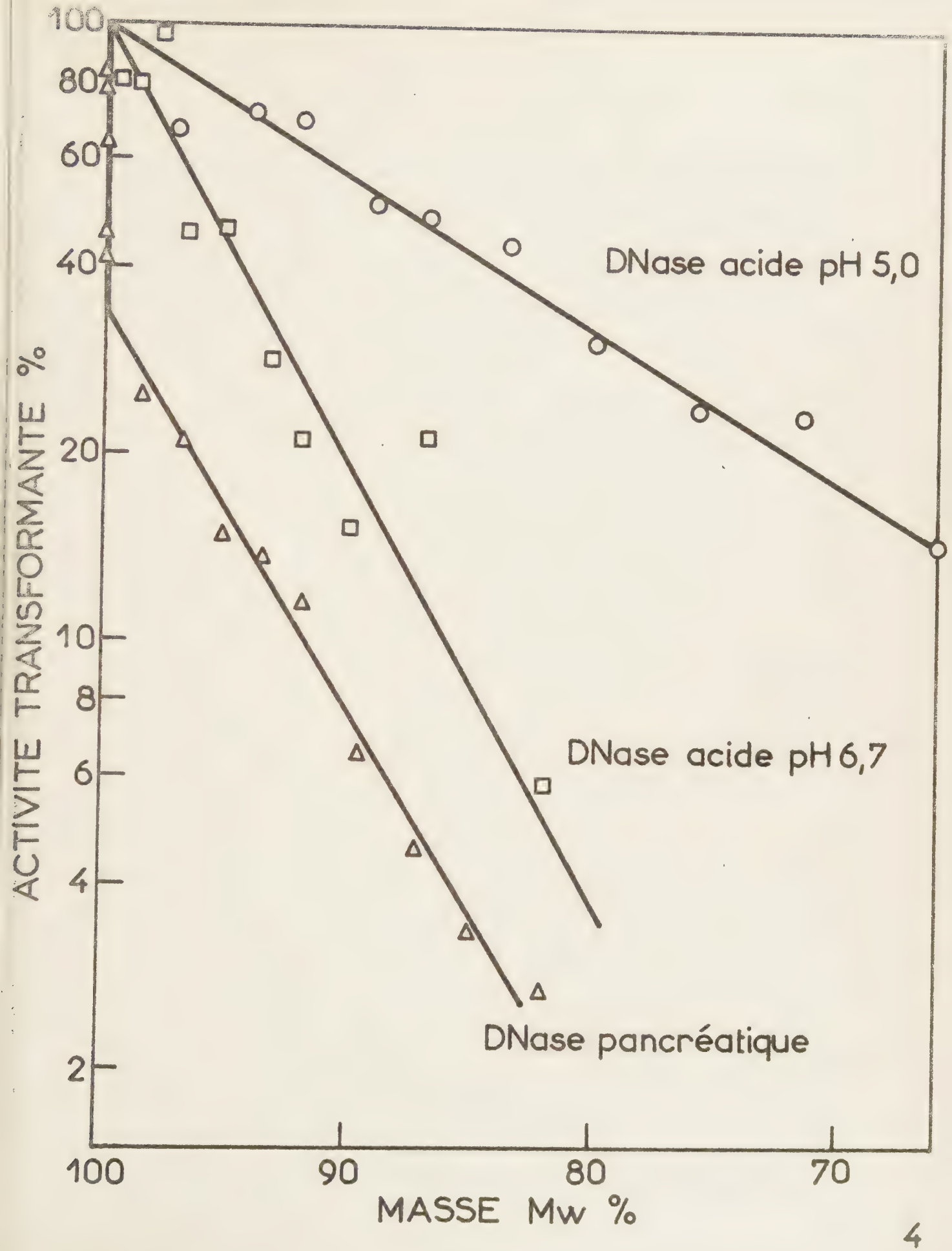
Figure 4

INACTIVATION DE L'ADN D'HEMOPHILE (MARQUEUR N) PAR LA DNAse ACIDE ET PAR LA DNAse PANCREATIQUE EN FONCTION DE LA DEPOLYMERISATION DE L'ADN.

---

Conditions de traitement de l'ADN SKN 564 : voir fig.1
Cette représentation utilise les mêmes données expérimentales que la figure 3. Nous donnons dans cette figure les cinétiques concernant le marqueur N.
La masse de l'ADN au cours de la dépolymérisation a été calculée[x] à partir des valeurs $\eta$ sp/c de la figure 3.

x (voir figure 1)


100
80
60
40
20
10
8
6
4
2
ACTIVITE TRANSFORMANTE %
DNase acide pH 5,0
DNase acide pH 6,7
DNase pancréatique
100
90
80
70
MASSE Mw %

Il est montré ainsi, fait nouveau très important, que la DNAse acide n'agit pas de la même manière sur l'ADN selon qu'elle se trouve en solution physiologique et à pH5 ou à pH neutre en solution de force ionique très basse.

La représentation de ces résultats d'inactivation en fonction de la dépolymérisation de l'ADN : figure 4, montre de façon très évidente :

D'une part, la différence d'action de la DNAse aacide et de la DNAse pancréatique, cette dernière inactivant l'ADN dans des proportions appréciables alors que la masse de l'ADN est toujours restée à sa valeur initiale. Ce dernier résultat est en accord avec les données d'autres auteurs et, en particulier, avec celles déjà anciennes de S.ZAMENHOF, H.E.ALEXANDER et G.LEIDY (1953).

D'autre part, la différence dans l'effet inactivant d'un traitement d'ADN par la DNAse acide selon qu'il est effectué à pH5 et à pH neutre, si l'on prend comme terme de comparaison la chute de masse moyenne en poids que subit l'ADN; à même diminution de masse, la DNAse acide a un effet inactivant plus faible à pH5 qu'à pH6,7.

Ces différences ont été précisées comme suit. Les trois cinétiques de la figure 4. concernent l'inactivation du même marqueur génétique N, testée en utilisant la même préparation d'ADN ; elles sont exponentielles en fonction de la diminution de masse de l'ADN. Nous avons calculé, selon A.CHARLESBY (1954) le nombre statistique de ruptures dépolymérisantes qui ont été introduites dans l'ADN lorsque le marqueur N a reçu en moyenne une lésion léthale. L'ADN présente à ce moment o,63 ruptures diplotomiques par molécule si la DNAse acide agit à pH5 et o,2 ruptures lorsque la dégradation a lieu à pH6,7. Au même stade d'inactivation,

aucune scission moléculaire n'a eu lieu au cours du traitement par la DNAse pancréatique; dans ce dernier cas, la cinétique de dégradation est arrivée vers la fin du temps de latence et les molécules d'ADN ont subi près de 5o ruptures haplotomiques (communication personnelle de V.N.SCHUMACKER, E.G.RICHARDS,H.K.SCHACHMAN.).

Ces évaluations apportent des données supplémentaires sur le mécanisme d'action de la DNAse acide. Si à pH neutre il suffit de moins de ruptures qu'à pH5 pour introduire une lésion léthale dans un même marqueur génétique, l'inactivation est dûe en partie, dans les premières conditions opératoires, à d'autres évènements léthaux ; il y a tout lieu de croire que ceux-ci sont des scissions haplotomiques de l'ADN, mises en évidence par G.BERNARDI dans la cinétique d'action de la DNAse à pH5 (G.BERNARDI et C.SADRON 1961 et 1964). Même à pH5 il est difficile de croire que la DNAse acide n'agit que par ruptures simultanées des deux brins de l'ADN, ce qui impliquerait que moins d'une rupture diplotemique par molécule suffit à inactiver un segment restreint de la molécule d'ADN (marqueur N). Sur la base de ces résultats nous concluerons que la DNAse acide agit sur l'ADN par deux mécanismes de rupture (diplotomique et haplotomique ) qui s'associent dans des rapports différents selon les conditions opératoires.
Ce résultat a été confirmé par des expériences réalisées avec des lots de DNAse acide et sur des préparations d'ADN différentes.

Cependant les cinétiques d'inactivation semblent dépendre quelque peu du matériel utilisé. Les cinétiques que nous avons présentées sont parmi celles qui donnent les plus grands écarts dans les résultats des différents traitements

enzymatiques. Si nous recvaluons le nombre de ruptures dépolymérisantes en confrontant tous nos résultats, la moyenne expérimentale de ces ruptures, produites sur une molécule d'ADN au cours des différents traitements enzymatiques, sera de

o,55 ruptures par DNAse acide à pH5
o,3o " " " " pH6,7
o,o " " " pancréatique

lorsque le marqueur N a reçu une lésion léthale.
Lorsque les marqueurs S ou SN sont touchés par une lésion léthale, ces valeurs moyennes du nombre de ruptures dépolymérisantes introduites dans les molécules d'ADN par la DNAse acide sont de :

o,42 (à pH5) et o,25 (à pH6,7) pour le marqueur S
o,2o (à pH5) et o,15 (à pH6,7) pour le marqueur SN

Lorsque nous considérons les résultats d'inactivation des marqueurs de l'Hemophile par la DNAse pancréatique, nous constatons (figure 4.) que c'est vers la fin du temps de latence que le marqueur N a reçu en moyenne une lésion inactivante. Selon des données récentes non publiées de V.N.SCHUMAKER, E.G.RICHARDS et H.K.SCHACHMAN (voir ces auteurs 1956, et C.A.THOMAS Jr.1956) chaque molécule d'une préparation d'ADN de $M_w$=12.1o$^6$ présente au moins 5o scissions haplotomiques à la fin du temps de latence; ce nombre de scissions est suffisamment élevé pour que l'on puisse interpréter l'inactivation de l'ADN par la DNAse pancréatique comme résultant d'une lésion directe des marqueurs.
A partir de ces données, la cinétique d'action de la DNAse pancréatique étant constante au cours du temps, on peut évaluer à chaque instant le nombre de ruptures subies en moyenne

par molécule d'ADN, et le mettre en relation avec le nombre de lésions inactivantes détectées.
Ainsi, d'après les résultats exprimés dans la figure 4., lorsque le marqueur de résistance à la novobiocine a reçu statistiquement une lésion inactivante, la molécule d'ADN de masse $M_w = 12.10^6$ qui le porte a subi 43 ruptures haplotomiques. Il faut donc qu'il y ait une rupture par région de $M_w = 280.000$ pour que le marqueur N soit inactivé, ce qui lui confère une taille, relative à l'efficacité d'inactivation de la DNAse pancréatique, de l'ordre de 430 paires nucléotidiques. D'une manière analogue on peut évaluer à 410.000 et à 1.425.000 les segments correspondant aux marqueurs S et SN.[x]

Les résultats d'inactivation par la DNAse acide ne peuvent être interprétés de la même façon.
A partir de diverses données expérimentales, nous avons déterminé le nombre relatif des deux types de ruptures produites par la DNAse acide sur l'ADN, lorsque la DNAse acide agit à pH5 : voir note page 15 et tableau I. Nous en déduisons que la DNAse acide, à pH5, produit 1 à 4 ruptures haplotomiques pour 1 rupture diplotomique.
Le nombre total de liaisons diesters rompues par la DNAse acide à pH5, à un niveau de dégradation correspondant à une lésion inactivante par marqueur N, serait donc de deux à quatre par molécule de masse moyenne en poids = $12.10^6$ daltons. (Ce nombre est respectivement de l'ordre de 2, ou est à peine égal à 1, lorsqu'on considère l'inactivation du marqueur S ou l'inactivation simultanée de S et de N).

---

x Ces évaluations peuvent être comparées à celles de J.H. STUY (thèse 1961) qui, d'après des données d'inactivation des mêmes régions génétiques par la DNAse pancréatique et par des radiations ionisantes, attribue un segment de $0,5.10^5$, $8,2.10^5$ et $18,8.10^5$ aux cibles respectives N,S et SN.

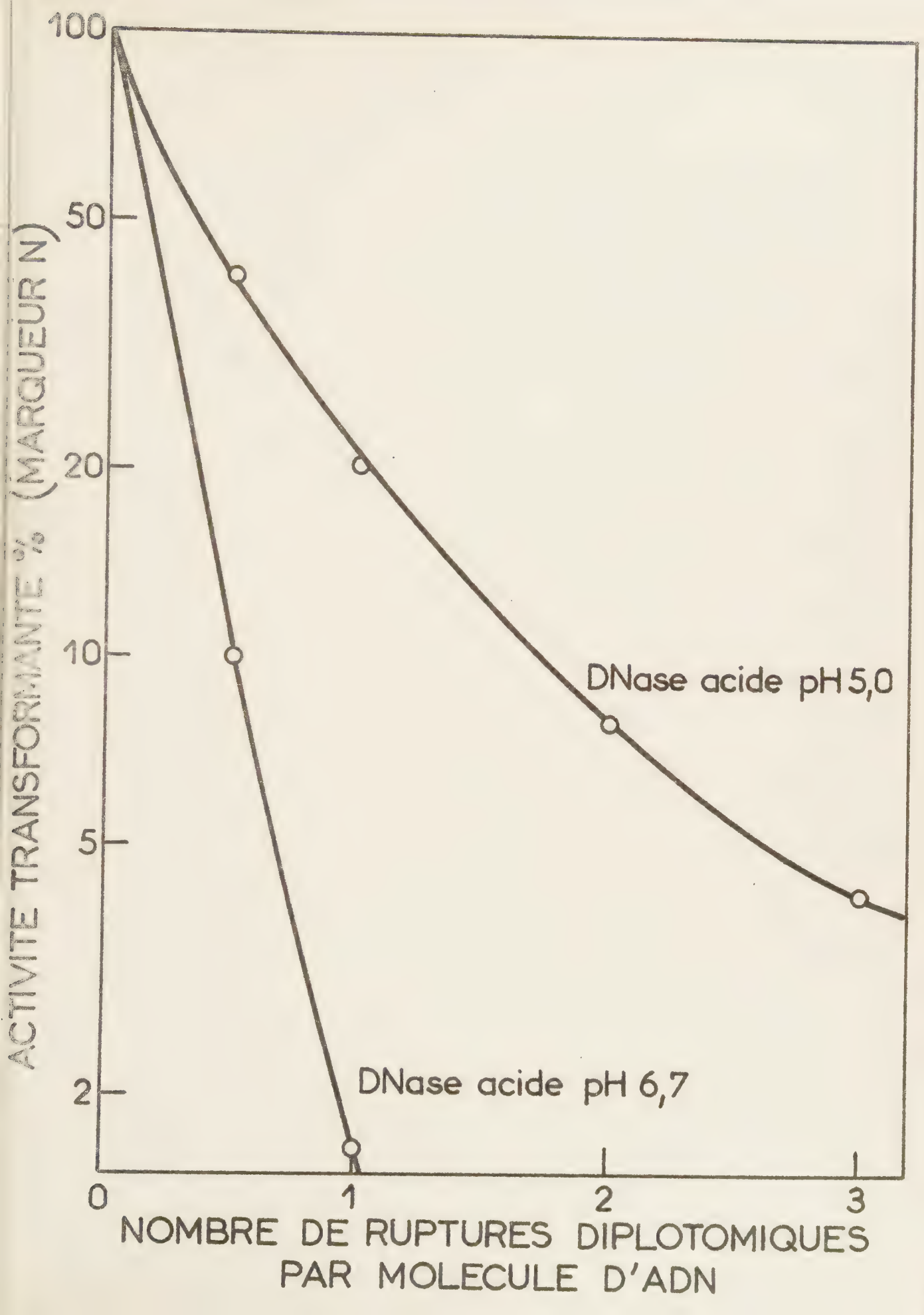
Figure 5

DIMINUTION DE L'ACTIVITE TRANSFORMANTE DE L'ADN D'HEMOPHILE (MARQUEUR N) en FONCTION DU NOMBRE DE RUPTURES DIPLOTOMIQUES DE L'ADN PRODUITES PAR LA DNAse ACIDE

---

Conditions de traitement de l'ADN SKN 564 : voir Fig.1

Le nombre de ruptures dépolymérisantes de l'ADN a été calculé selon A.CHARLESBY (1954) d'après la diminution de masse de l'ADN au cours des traitements enzymatiques à pH 5 et à pH 6,7.


100
50
20
10
5
2
ACTIVITE TRANSFORMANTE % (MARQUEUR N)
DNase acide pH 5,0
DNase acide pH 6,7
0
1
2
3
NOMBRE DE RUPTURES DIPLOTOMIQUES
PAR MOLECULE D'ADN

Ces valeurs sont beaucoup trop basses pourque l'inactivation de l'ADN puisse être considérée comme étant une conséquence directe des lésions introduites dans les marqueurs génétiques. L'inactivation doit donc être dûe, pour une très grande part, à un effet à distance des lésions de l'ADN.

Nous avons considéré 2 explications possibles de ce phénomène d'inactivation à distance :

1°) La dégradation de l'ADN par la DNAse acide, contrairement à la dégradation par la DNAse pancréatique, empêche la pénétration de l'ADN par les bactéries.

2°) La dégradation de l'ADN par la DNAse acide empêche son intégration dans le génome bactérien.

Ces deux hypothèses tiennent compte des possibilités d'interférence des lésions de l'ADN avec les deux étapes fondamentales de la transformation bactérienne. Elles ont été examinées par différentes études expérimentales décrites dans le 3ème chapitre.

La figure 4 mérite une dernière remarque. La décroissance exponentielle de l'activité transformante en fonction de la diminution de la masse de l'ADN, souligne que la masse moyenne des molécules d'ADN intervient dans leur capacité de transfert des caractères génétiques qu'elles portent; cette idée sera reprise dans le troisième chapitre. Par ailleurs la représentation en coordonnées semi-logarithmiques de la chute d'activité transformante en fonction du nombre de ruptures diplotomiques des molécules d'ADN, n'est pas linéaire mais présente une courbure : figure 5. Ce résultat est en accord avec la représentation de l'inactivation de l'ADN en fonction du temps d'action de la DNAse (figure 3 ) ; en effet le nombre de ruptures est lié à la durée du traitement puisque la représentation $1/M = f(t)$ est linéaire.

Note

Evaluation du nombre total de liaisons rompues par rapport au nombre de liaisons rompues par le mécanisme diplotomique dans l'ADN natif soumis à l'action de la DNAse acide à pH5.

Le rapport r du nombre total de liaisons rompues au nombre de liaisons rompues par le mécanisme diplotomique a pu être évalué de la manière suivante sur des préparations d'ADN de sources diverses :

A - E.G.RICHARDS et G.BERNARDI ont trouvé, par titration, (données non publiées, référence dans G.BERNARDI et C.SADRON 1964 a et b) qu'un nombre total de 1o à 2o ruptures (valeur vraisemblablement sur estimée pour des raisons techniques)sont nécessaires pour diminuer de moitié la masse moléculaire moyenne en poids d'ADN natif de $M_w = 6.1o^6$, par action de DNAse acide à pH5. Etant donné que trois coupures (c'est-à-dire la rupture de six liaisons phosphoesters) sont nécessires pour obtenir ce résultat par un mécanisme diplotomique (A.CHARLESBY), une limite supérieure du rapport r peut être fixée à 1,7 - 3,3. Nous rappellerons que 2oo ruptures sont nécess ires pour obtenir le même effet lorsque l'ADN est dégradé (mécanisme haplotomique) par la DNAse pancréatique (C.A.THOMAS Jr 1956).

B - 1) G.BERNARDI et C.SADRON (1964 a et b) ont mesuré la masse moléculaire de l'ADN d'erythrocytes de poulet par diffusion de lumière, au cours de la digestion enzymatique de l'ADN; ces mesures ont

également été effectuées sur l'ADN ultérieurement dénaturé. Si on néglige l'hydrolyse thermique de l'ADN et la séparation incomplète de ses 2 brins (qui se compensent en partie), les valeurs de masse peuvent être utilisées pour calculer le rapport r qui, dans ce cas, se situe entre 1,45 et 1,9 (tableau I). Les données de ce tableau suggèrent qur r tend à augmenter lorsque la masse moléculaire décroît.

2) E.T.YOUNG et R.L.SINSHEIMER (1965) ont donné des valeurs de masse moléculaire moyenne en poids, calculées à partir de résultats de sédimentation de zone ; ces mesures ont été effectuées sur l"ADN de Phage λ -sous forme native et dénaturée (par la soude)-prélevé au cours de sa dégradation par la DNAse acide. Quoique ces auteurs ne voyaient dans ces données que le reflet d'un mécanisme diplotomique, le tableau I montre qu'une valeur de r située entre 1,2 et 1,6 peut être évaluée à partir de leurs résultats expérimentaux.

Des études sont en cours dans le laboratoire de G.BERNARDI en vue de préciser encore plus étroitement la valeur de r. Toutefois l'accord entre ces trois séries de résultats tout à fait indépendants est assez bon et on peut considérer que la valeur de r est de l'ordre de 1,5 à 3. Par conséquent le rapport du nombre de ruptures haplotomiques au nombre de ruptures diplotomiques est de l'ordre de 1 à 4 (voir tableau I).

Tableau I

Dégradtion de l'ADN par la DNAse acide à pH5

| Temps de digestion (min.) | ADN natif $M_w.10^{-6}$ | Scissions | ADN dénaturé $M_w.10^{-6}$ | Scissions | Sc.ADN dén. / Sc.ADN nat. col(5)/col(3) |
|---|---|---|---|---|---|
| (1) | (2) | (3) | (4) | (5) | (6) |
| ADN d'erythrocytes de poulet (dans G.BERNARDI et C.SADRON 1964b : tableau III) | | | | | |
| 0 | 3,8o | - | 2,2o | - | - |
| 3o | 2,35 | 1,85 | 1,16 | 2,7o | 1,45 |
| 6o | 1,75 | 3,51 | o,75 | 5,82 | 1,66 |
| 9o | 1,45 | 4,86 | o,54 | 9,2o | 1,9o |
| ADN de Phage λ (dans E.T.YOUNG et R.L.SINSHEIMER 1965 : tableau I) | | | | | |
| 0 | 27,3 | - | 14,5 | - | - |
| 5 | 24,9 | o,29 | 12,5 | o,47 | 1,62 |
| 1o | 24,2 | o,36 | 9,3 | 1,52 | 4,22 |
| 15 | 2o,3 | 1,oo | 9,7 | 1,35 | 1,35 |
| 2o | 16,3 | 1,8o | 8,o | 2,14 | 1,19 |
| 45 | 1o,9 | 3,65 | 4,5 | 5,6o | 1,53 |

- Le nombre de scissions (colonnes 3 et 5) a été calculé par la formule de A.CHARLESBY (1954) (voir méthodes expérimentales)
- Le rapport r du nombre de liaisons diesters totales rompues par rapport au nombre de ces liaisons rompues par le mécanisme diplotomique, par molécule initiale d'ADN, au cours de la dégradation, est donnée par la

colonne 6.

Note. Le nombre de ruptures haplotomiques, relatif au nombre de ruptures diplotomiques, est donné par : $(r - 1).2$.

Le nombre total de liaisons diesters rompues = nombre de ruptures haplotomiques + (nombre de ruptures diplotomiques).2.

SENSIBILITE DES DIFFERENTS MARQUEURS LIES DE L'HEMOPHILE A L'ACTION INACTIVANTE DE LA DNAse ACIDE ET DE LA DNAse PANCREATIQUE.
EFFET DE LEUR ACTION SUR LA LIAISON DES MARQUEURS.

Nous avons mis à profit l'existence de marqueurs liés chez l'Hémophile pour approfondir notre analyse de l'effet inactivant de la DNAse acide sur l'ADN.

L'inactivation des marqueurs S et N a été étudiée parallèlement au cours des différents traitements enzymatiques ; ces deux marqueurs ont été choisis pour leur éloignement sur la molécule d'ADN considérée, et pour leur expression phénotypique unéquivoque comparée à celle du marqueur K.

Les figures 6 (A)(B) et (C) résument l'ensemble des résultats obtenus : inactivation de S, de N, et de SN , au cours de dégradation enzymatique par la DNAse acide à pH5 (A) et à pH6,7 (B) et par la DNAse pancréatique (C) ; la somme des inactivations de S et de N est représentée dans chaque graphique par la courbe S+N.

A) Sensibilité relative des marqueurs aux traitements enzymatiques

Dans tous les cas le marqueur N est inactivé plus lentement que le marqueur S, et dans les trois conditions de dégradation enzymatique le marqueur S présente une sensibilité (voir Méthodes expérimentales), exprimée par rapport à celle du marqueur N, de l'ordre de 1,3.

Cette sensibilité relative des deux marqueurs est exprimée

Figures 6.

INACTIVATION DES MARQUEURS N ET S ET DU GROUPE DE MARQUEURS LIES SN AU COURS DES TRAITEMENTS DE L'ADN D'HEMOPHILE PAR DNAse ACIDE ET PAR DNAse PANCREATIQUE. EFFETS SUR LA LIAISON DES MARQUEURS N ET S.

---

Conditions de traitement de l'ADN SKN 564 : voir figure 1.

Tests de transformation à saturation d'ADN (1µg/ml de milieu de transformation)

La somme des inactivations des marqueurs N et S est donnée par la courbe S + N ; cette courbe détermine par rapport à la courbe SN l'effet de déliaison produit par les différents traitements enzymatiques.

Figure 6 (A) : Inactivation par la DNAse pancréatique

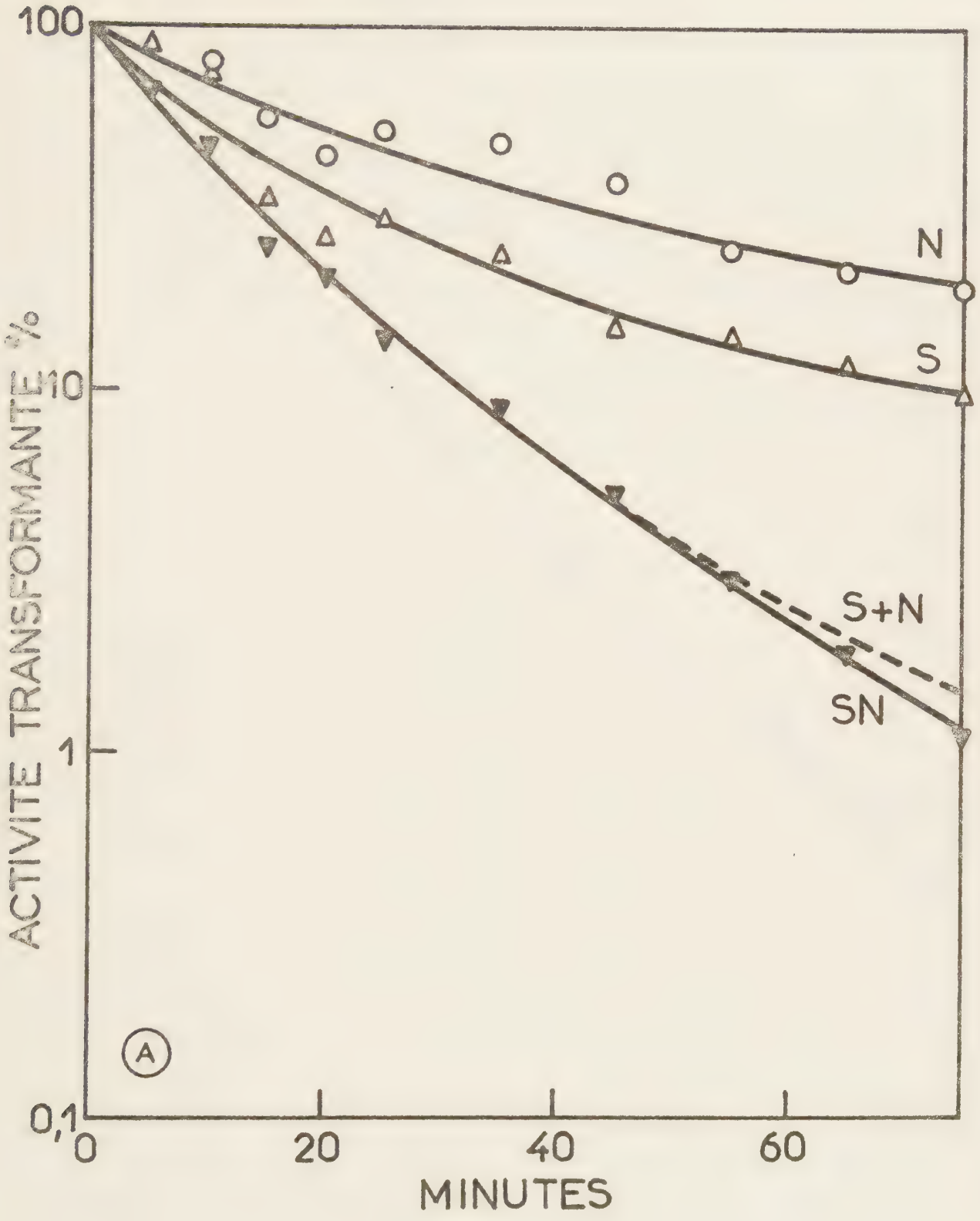
Test de survie des marqueurs génétiques selon les conditions opératoires de J.H.STUY (1961) : expression en milieu solide.

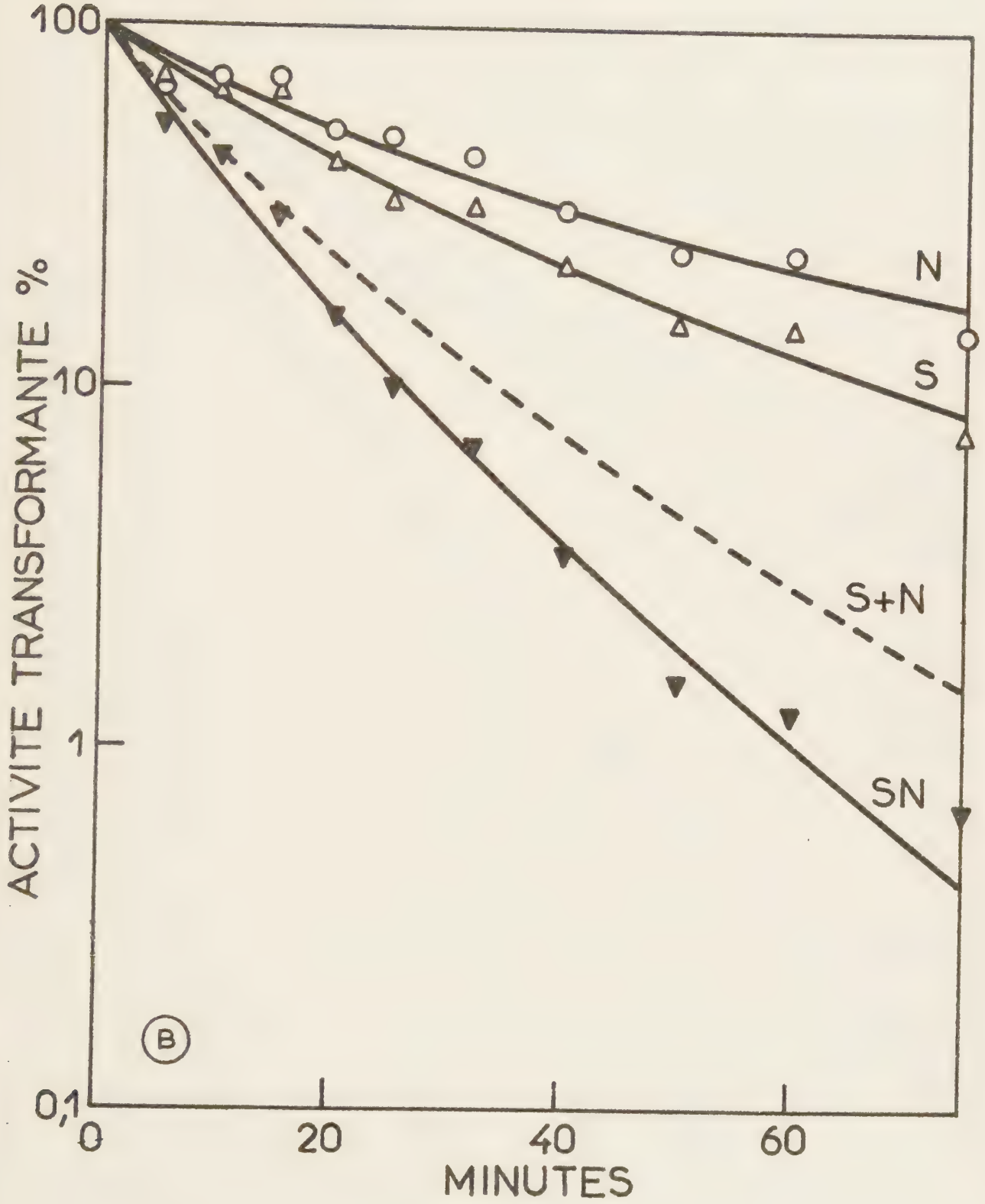
Figures 6 (B) et (C) : Inactivation par la DNAse acide

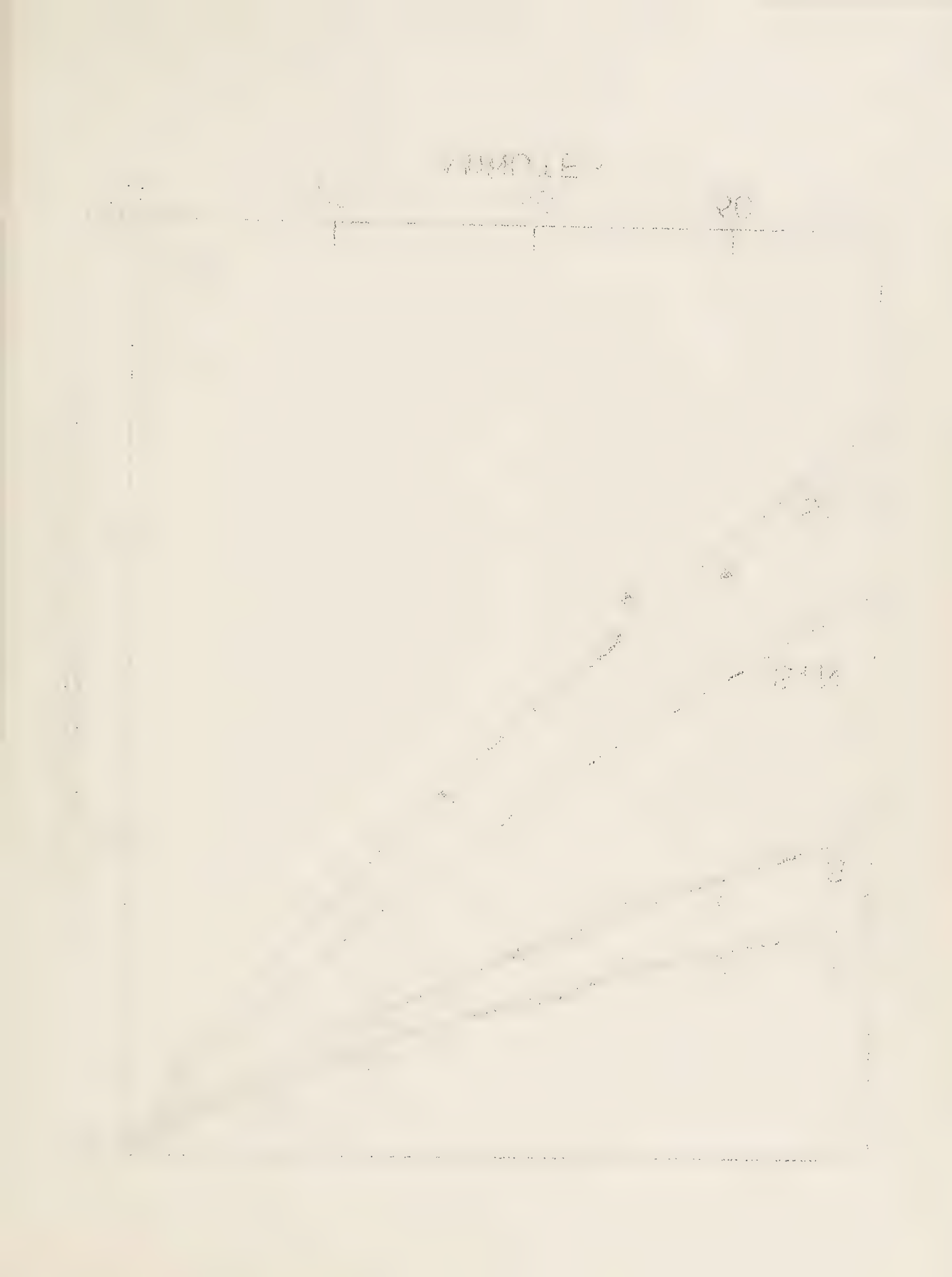
(B) à pH 5, $\mu$ = 0,15

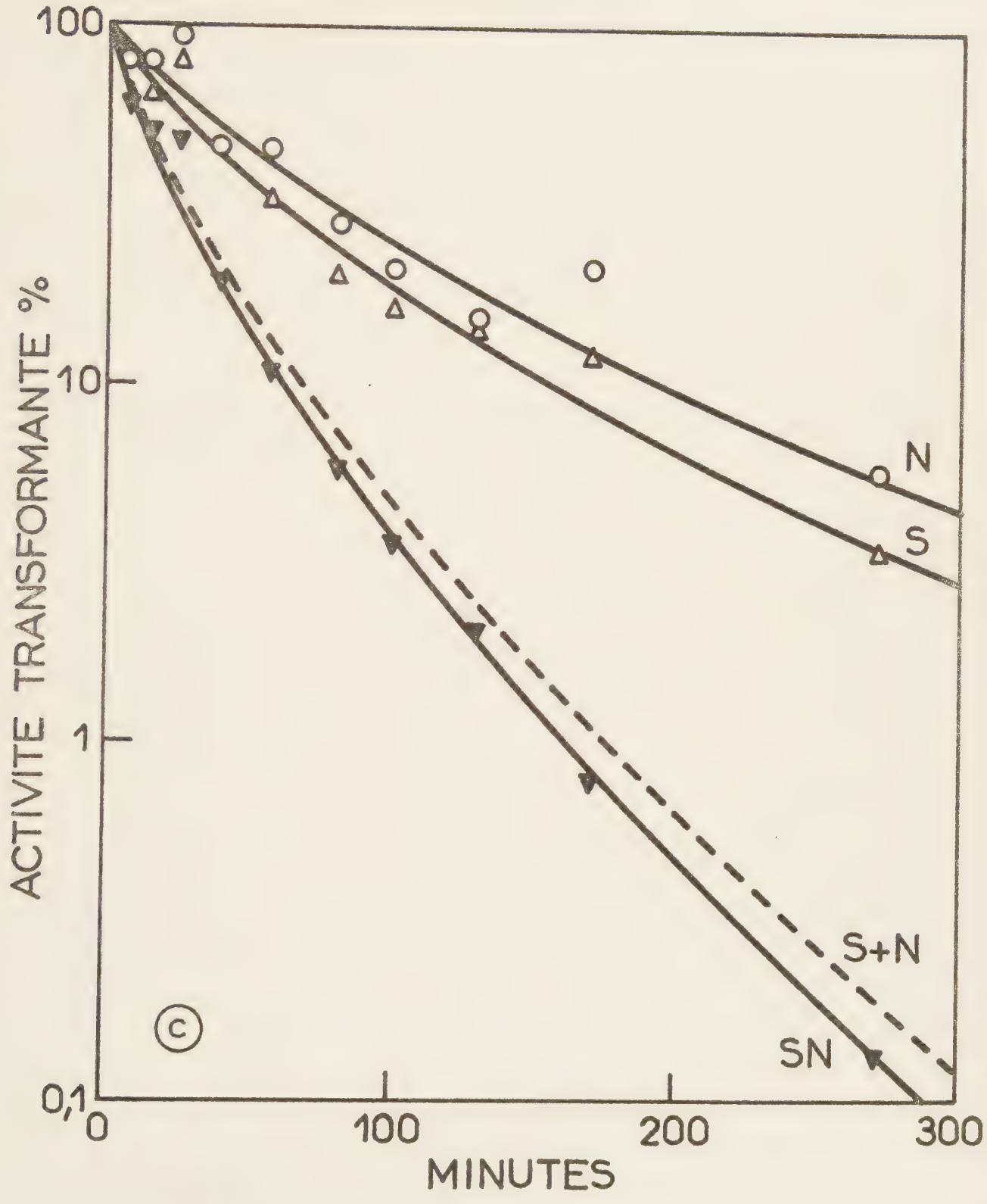
(C) à pH 6,7, $\mu$ = 0,01

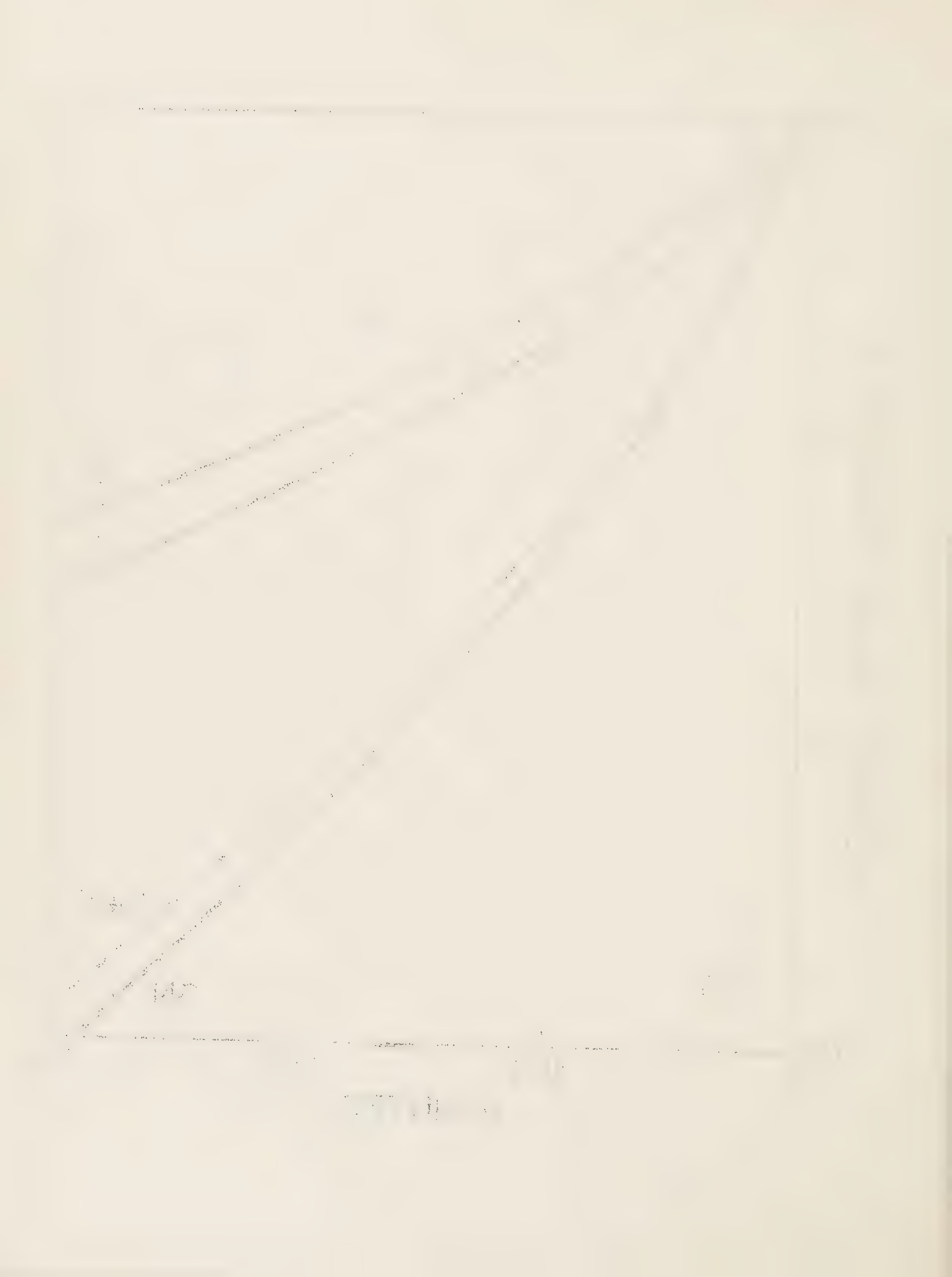
Test de survie des marqueurs génétiques : expression en milieu liquide.


100
10
1
0,1
ACTIVITE TRANSFORMANTE %
N
S
S+N
SN
A
0
20
40
60
MINUTES


100
10
1
0,1
ACTIVITE TRANSFORMANTE %
0
20
40
60
MINUTES
N
S
S+N
SN
B




100
10
1
0,1
ACTIVITE TRANSFORMANTE %
0
100
200
300
MINUTES
N
S
S+N
SN
©



également par le nombre respectif de ruptures de la molécule d'ADN, nécessaire à leur inactivation ; nous avons évalué ( voir plus haut) à o,63 et o,45 le nombre de ruptures diplotomiques introduites par action de la DNAse acide à pH5 dans l'ADN, lorsque les marqueurs N et S, respectivement, présentent une lésion inactivante. Lorsque la DNAse acide agit à pH 6,7, ces ruptures sont respectivement au nombre de o,2 et o,15.

B) Effet des différents traitements enzymatiques sur la liaison des marqueurs.

Il était particulièrement intéressant de comparer ici l'effet de la DNAse acide à celui de la DNAse pancréatique. Alors que S.H.GOODGAL (1961) n'observe pas de déliaison des marqueurs S et N de l'Hémophile[x], J.H.STUY (1961a) présente des résultats expérimentaux en faveur d'une importante déliaison des marqueurs S et N par action de la DNAse pancréatique. En utilisant les conditions opératoires de cet auteur (expression phénotypique, en milieu solide, des caractères transmis par transformation) nous n'avons pu retrouver, pas plus qu'avec nos techniques habituelles, une séparation importante de ces deux marqueurs ; la figure 6(C) donne le résultat le plus favorable obtenu selon la technique de J.H. STUY.

Par contre nos résultats expérimentaux exprimés dans les figures 6(A) et (6B) nous inciteraient à affirmer que la DNAse acide réalise des taux de déliaison des marqueurs S et N assez élevés, en particulier lorsqu'elle agit à pH5. A pH 6,7 on observe un effet de déliaison très faible ; ceci

x une déliaison consistant en une séparation de marqueurs génétiques actifs, portés initialement par une même molécule d'ADN.(voir"Méthodes expérimentales")

pourrait résulter de ce que la DNAse acide produit plus de ruptures haplotomiques à pH6,7 qu'à pH5.
En vue de préciser ces résultats et d'essayer d'évaluer le taux de séparation des deux marqueurs en fonction des lésions inactivantes subies par ce segment nucléotidique, nous avons repris le mode de représentation des résultats d'inactivation en fonction de la chute de masse de l'ADN. Cette représentation, linéaire en coordonnées semi-logarithmiques, et donnant accès par calcul direct au nombre de ruptures dipplotomiques subies par l'ADN, nous a permis de préciser que :
1) lorsque l'ADN est traité par la DNAse acide à pH5, la région nucléotidique comportant les marqueurs S et N a subi 5,5 lésions (courbe SN) alors que les marqueurs génétiques n'ont reçu que 4,5 lésion inactivantes (courbe S+N) ; ainsi une lésion sur 5,5 serait dûe à une rupture entre les deux marqueurs ; cette rupture a un effet de déliaison puisqu' elle n'affecte pas l'expression individuelle des marqueurs.
2) d'une manière analogue le nombre de déliaison S-N serait de 1 pour 17,5 lésions inactivantes lorsque la DNAse acide agit à pH6,7.

Cependant si l'on considère l' tape de la cinétique de la dépolymérisation de l'ADN qu'il faut atteindre pour réaliser ces effets de déliaison par la DNAse acide on voit que

- à pH5 on observe pour les marqueurs S et N 1 déliaison et 4,5 lésions inactivantes lorsque la molécule entière n'a subi que 1,5 ruptures diplotomiques et, comme nous l'avons précisé plus haut, 1,5 à 6 ruptures haplotomiques.
- à pH6,7, 2 à 2,5 ruptures diplotomiques et 6 à 3o ruptures haplotomiques[x] seraient suffisantes pour réaliser

Figures 7

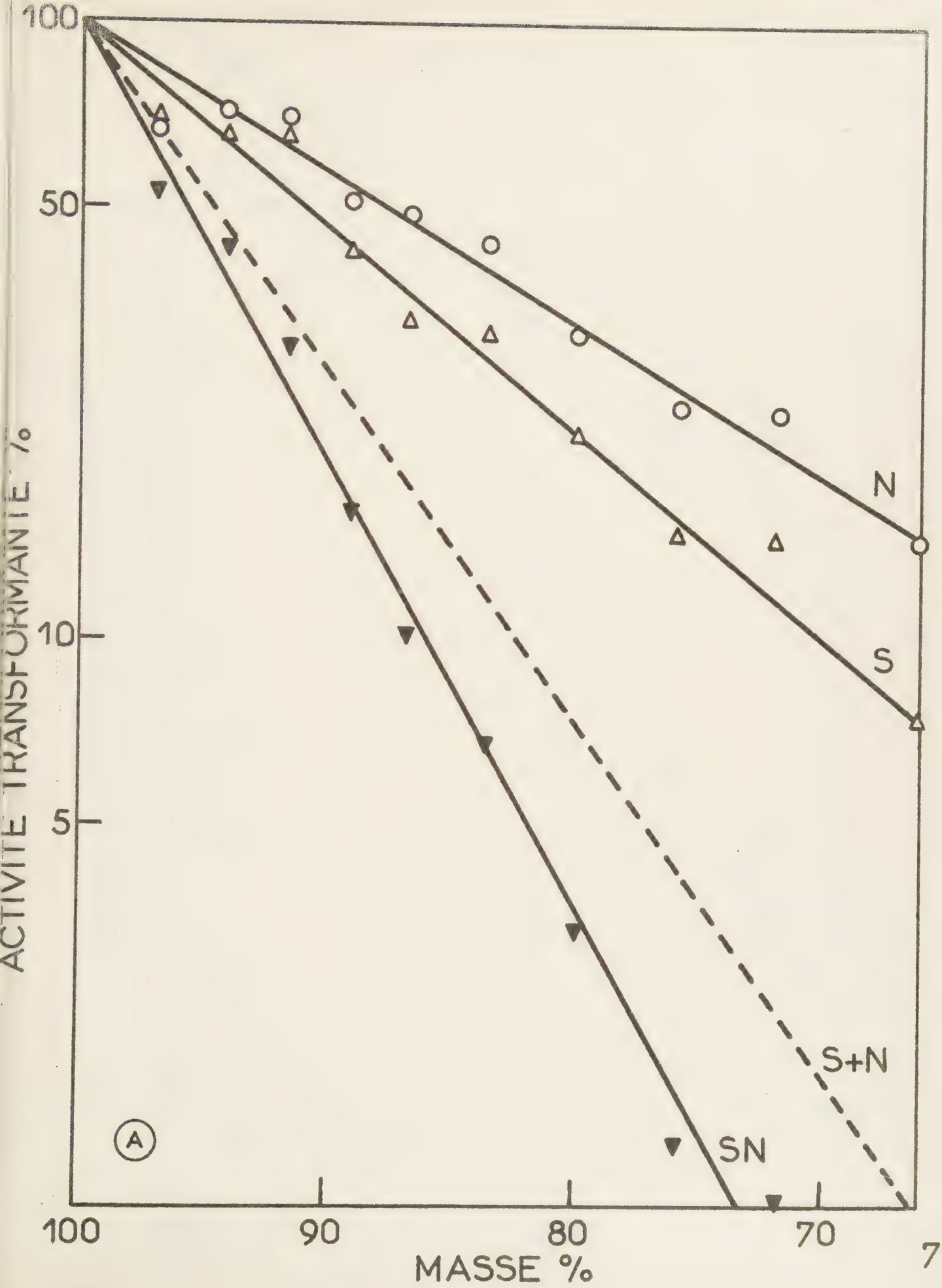
INACTIVATION DES MARQUEURS N ET S ET DU GROUPE DE MARQUEURS LIES SN EN FONCTION DE LA DEPOLYMERISATION DE L'ADN D'HEMOPHILE PAR LA DNAse ACIDE.

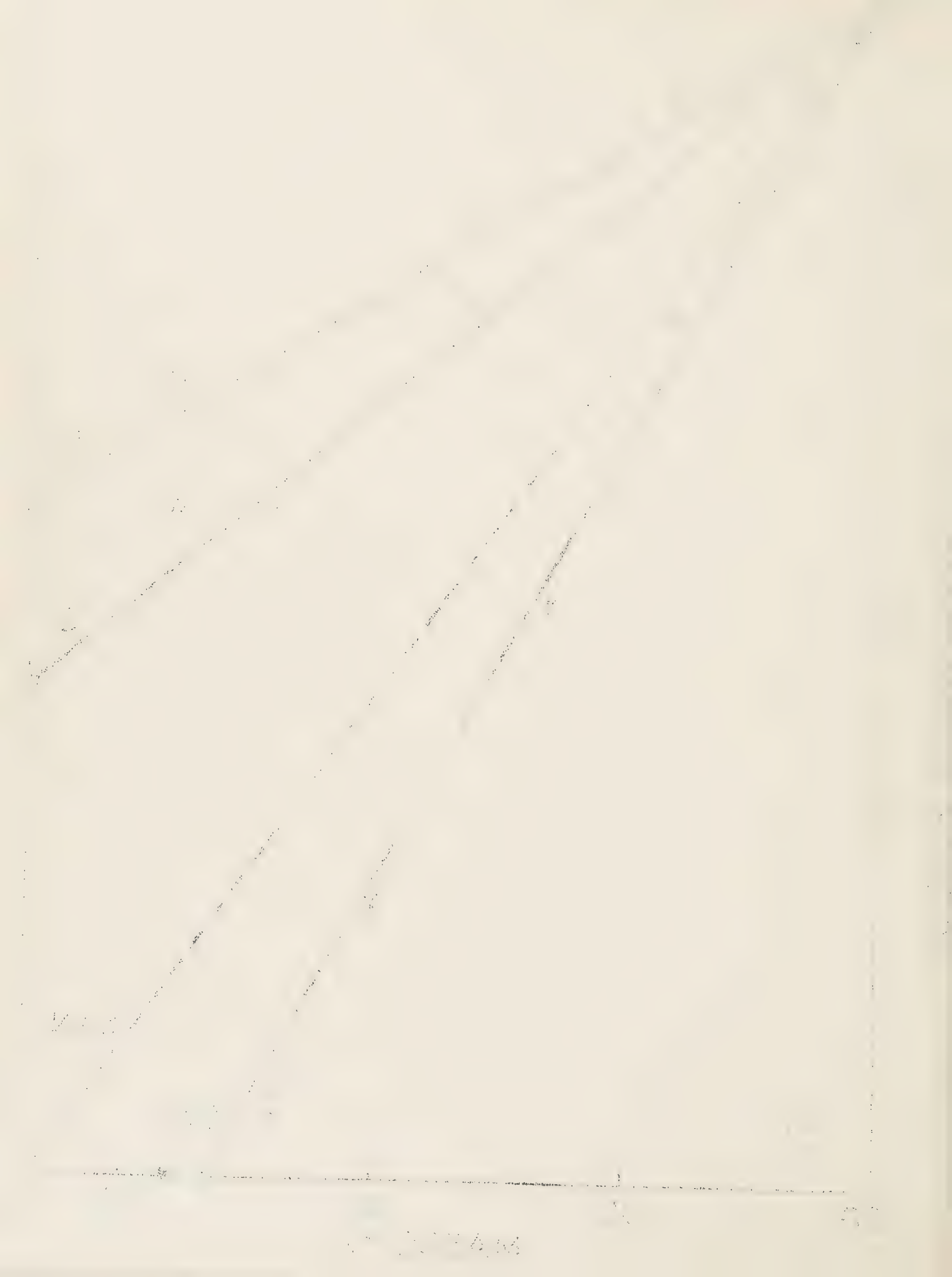
---

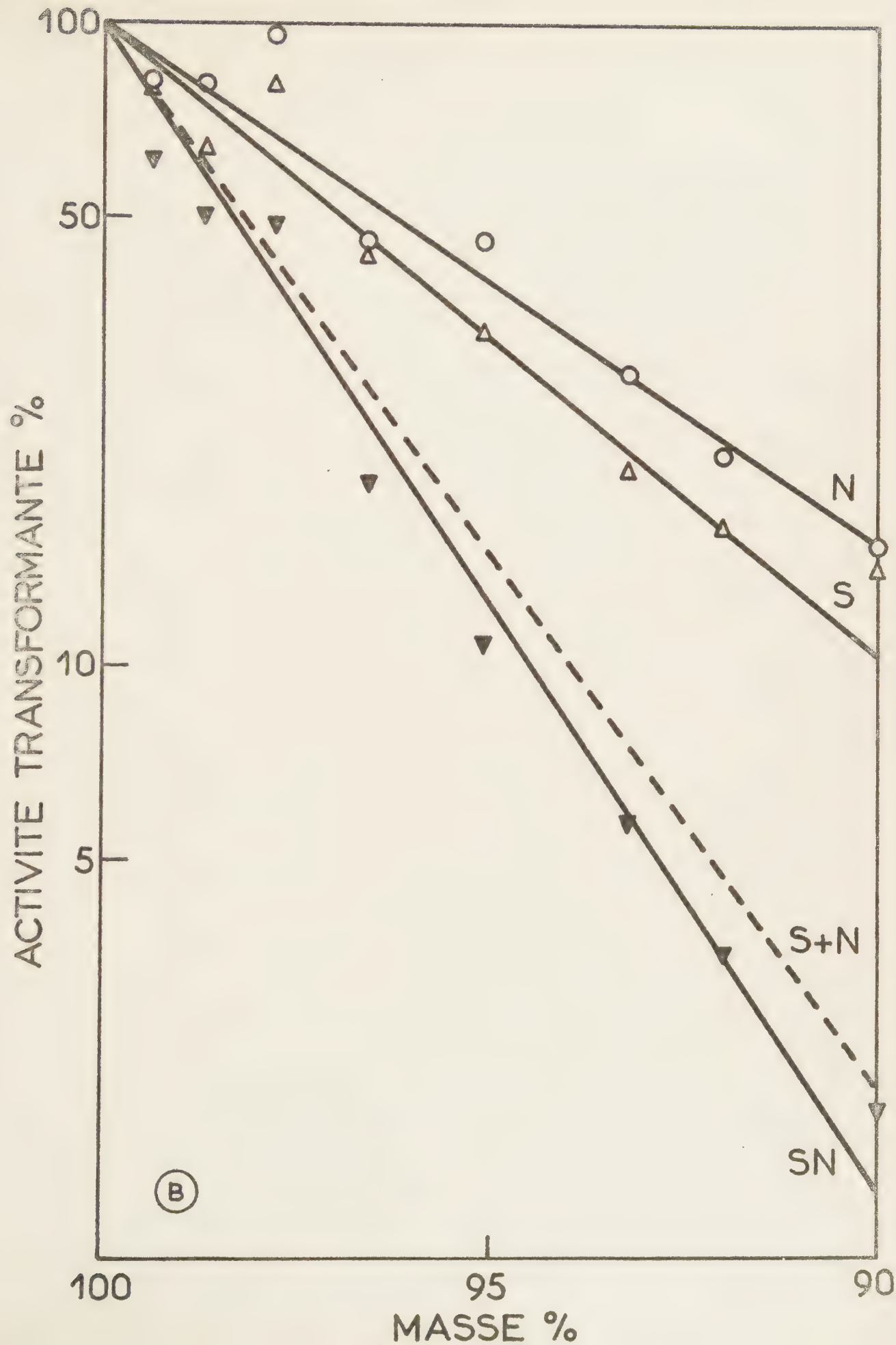
Conditions de traitement de l'ADN SKN 56' : voir fig.1

Ces graphiques reprennent les données expérimentales des figures 6(B) et (C). Pour la détermination de la chute de masse de l'ADN au cours des traitements enzymatiques voir fig.1.

Ils donnent l'inactivation individuelle et simultanée des marqueurs S et N par la DNAse acide à pH 5 (fig.7A) et à pH 6,7 (fig.7B). Les droites S+N représentent la somme des inactivations des marqueurs S et N testés séparément.


100
50
10
5
ACTIVITE TRANSFORMANTE %
N
S
S+N
SN
A
100
90
80
70
MASSE %




100
50
10
5
ACTIVITE TRANSFORMANTE %
N
S
S+N
SN
B
100
95
90
MASSE %

1 déliaison SN et 16,5 lésions inactivantes dans les marqueurs.
On constate donc qu'il y a environ autant de ruptures par molécule d'ADN que de lésions+déliaisons par groupe de marqueurs S-N étudié.
Ce résultat confirme l'effet inactivant à longue distance des ruptures d'ADN par DNAse acide.

Nous ajouterons, quoique les données sur lesquelles nous nous appuyons sont très approximatives, que les marqueurs N,S et la région SN représentent des segments assez restreints ($N=0,3-0,6.10^6$ daltons, $N=0,4-0,8.10^6$ daltons et $SN=1,4-1,9.10^6$ daltons : voir plus haut) de la molécule d'ADN de masse $12.10^6$ daltons.

Si l'on examine cet ensemble de données expérimentales, on constate que les phénomènes observés ne peuvent être expliqués en termes simples de déliaison. On ne peut admettre que les ruptures haplotomiques participent d'une manière efficace et importante à une séparation des marqueurs ; à pH6,7 l'effet de "déliaison"observé est beaucoup plus faible qu'à pH5 . Les ruptures diplotomiques ne suffisent pas à elles seules à expliquer ce taux de déliaison.

Tenant compte de l'effet inactivant important des ruptures de la DNAse acide -1 rupture étant sensiblement = 1 lésion inactivante par région génétique S-N - nous proposons à vérification ultérieure une hypothèse qui pourrait rendre compte des effets de déliaisons observés.

x Nous avons vu (voir plus haut) qu'il faut respectivement o,63 et o,2o ruptures diplotomiques à pH5 et à pH6,7, c'est-à dire 1,26 et 0,4 ruptures de liaison phosphodiester, pour avoir un même effet inactivant. Si,à pH5 le nombre total de liaisons rompues est égal à 1,26+o,63 (pour r=1,5 : voir note page 13o et tableau I), il est vraisemblable qu'il y a à pH7 six fois plus de ruptures haplotomiques qu'à pH5; ainsi le nombre total de liaisons rompues est le même aux deux pH. Il en est demême si on admet r=3.

Elle est basée sur les données suivantes : 1°) les marqueurs S et N de la préparation d'ADN SKN 564 utilisée pour cette expérimentation présentent un degré de liaison de 35% ; parmi les molécules d'ADN portant ces marqueurs, une molécule pour 3 contient donc à la fois les deux cistrons correspondants. 2°) Par ailleurs diverses observations expérimentales indiquent que les marqueurs liés sont situés préférentiellement sur les grandes molécules d'une préparation d'ADN : a) le degré de liaison de différents marqueurs est d'autant plus grand que la masse moyenne de la préparation d'ADN est plus grande (STUY thèse 1961 : expériences de rupture mécanique d'ADN) b) le fractionnement des molécules d'une préparation d'ADN selon leur taille (M.R.CHEVALLIER, communication personnelle) permet de séparer les molécules doublement marquées (SN) des molécules ne portant qu'un seul marqueur (S ou N) les premières étant comprises dans les fractions d'ADN de taille supérieure aux secondes.

Si les molécules plus grandes , portant S et N, étaient inactivées plus rapidement que les plus petites molécules, portant seulement S ou N, les résultats d'inactivation respective de S, de N et de SN pourraient être en accord avec les représentations graphiques des figures 7. Le nombre plus important de ruptures haplotomiques, à pH6,7, pourrait également expliquer - dans cette interprétation- le taux de déliaison plus faible observé dans ces conditions opératoires.

Il semble en effet que l'effet de"déliaison" soit lié essentiellement aux ruptures du type diplotomique - à l'égard duquel le nombre de sites d'action sur l'ADN est limité.

# ANALYSE DE L'EFFET INACTIVANT DE LA DNAse ACIDE

## A.- POUVOIR COMPETITIF D'ADN TRAITE PAR DNAse

De l'ADN d'Hémophile portant le caractère de résistance à la novobiocine : N et dégradé par les deux DNAses : DNAse acide et DNAse pancréatique, a été mis en présence d'ADN non traité portant le caractère de résistance à l'Erythromycine : E ; par des tests de compétition nous avons alors déterminé l'inhibition , par l'ADN N, à la transformation des bactéries réceptrices par l'ADN E. Nous avons réalisé ces tests en nous inspirant des travaux de P.SCHAEFFER (1957 ; étude détaillée : thèse 1961). Cette étude montre dans quelle mesure le traitement subi par l'ADN influe sur son pouvoir compétitif, donc sur son pouvoir de pénétration dans les bactéries ( voir "Méthodes expérimentales")

Le pouvoir compétitif de l'ADN traité, tant par DNAse acide que par DNAse pancréatique, diminue d'une manière assez importante pendant toute la durée du traitement, malgré l'augmentation du nombre de molécules en présence : figures 13 (A et B). Cependant cette inhibition à la pénétration de l'ADN dans les bactéries est moins importante que la diminution d'activité transformante des marqueurs de l'ADN. Une partie de l'effet inactivant des DNAses reste imputable à l'intégration de l'ADN lésé.

L'effet inhibiteur des deux traitements enzymatiques sur la pénétration de l'ADN a été comparé en représentant le pouvoir compétitif des ADN traités en fonction de la chute de viscosité présentée par l'ADN. La figure 14 montre que la diminution du pouvoir compétitif de l'ADN est du même ordre, quelque soit le traitement enzymatique, à valeur de vis-

cosité de l'ADN comparable. Ce résultat met en évidence l'importance de la taille des molécules d'ADN lors de la sélection qui s'opère au moment de leur fixation sur les bactéries réceptrices.

Ainsi le nombre élevé de lésions que portent les molécules d'ADN traitées par la DNAse pancréatique ne semble pas défavoriser leur pénétration par rapport aux molécules peu lésées, traitées par la DNAse acide.

En retour, les ruptures extrèmement inactivantes dûes à la DNAse acide ne portent pas atteinte en particulier à la fixation de l'ADN sur les sites récepteurs des bactéries compétentes.

En montrant l'égalité, dans la pénétration bactérienne, des ADN traités par l'une ou par l'autre DNAse, ce test met en évidence que c'est au cours de la deuxième phase de la transformation qu'a lieu la différenciation des deux traitements enzymatiques, en ce qui concerne leur effet inactivant ;la distinction entre des lésions faites par la DNAse pancréatique et celles dûes à l'action de la DNAse acide se fait à l'intérieur de la cellule bactérienne .

## B.- INACTIVATION DE L'ADN D'HEMOPHILE PAR LA DNAse DE COLI.

Pour vérifier la conclusion à laquelle nous étions arrivés, selon laquelle les ruptures libérant un nucléoside terminal 3'P auraient un effet inactivant particulièrement important, nous avons testé, comparativement, l'effet inactivant des extrémités 5'P formées par les ruptures de la DNAse de Coli.

Figures 8

DEGRADATION DE L'ADN D'HEMOPHILE ($N_{2(A)}366$) PAR LA DNAse ACIDE A pH 5 ET PAR LA DNAse PANCREATIQUE.
- DEPOLYMERISATION - PERTE DE POUVOIR COMPETITIF-INACTIVATION

Les conditions de traitement de l'ADN $N_{2(A)}366$ sont les mêmes que celles décrites dans la figure 1. L'ADN de masse $M_w=13.10^6$, porte seulement le marqueur de résistance à la novobiocine.

Les deux graphiques représentent comparativement la chute de viscosité et les pertes de pouvoir compétitif et d'activité transformante (marqueur N) de l'ADN $N_{2(A)}366$ au cours de traitements par DNAse acide à pH 5 (fig.8A) et par DNAse pancréatique (fig.8B)

Viscosité : viscosité spécifique déterminée à un gradient de 57,5 $s^{-1}$

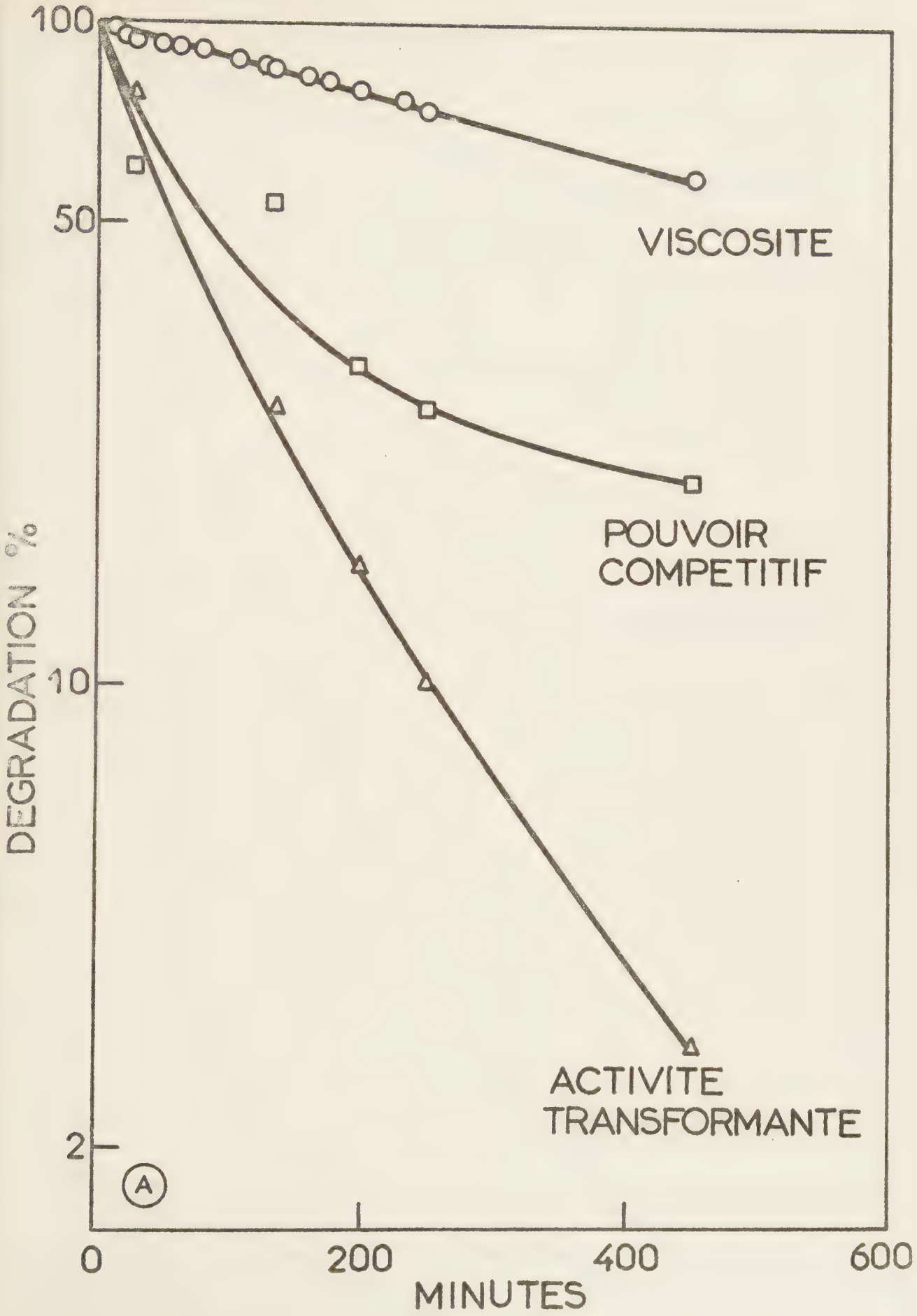
Pouvoir compétitif: il est donné par la perte d'activité transformante d'ADN E 465 (marqueur de résistance à l'erythromycine)qui résulte de l'addition dans le milieu de transformation, d'ADN $N_{2(A)}366$ préalablement dégradé par l'un ou l'autre des 2 enzymes

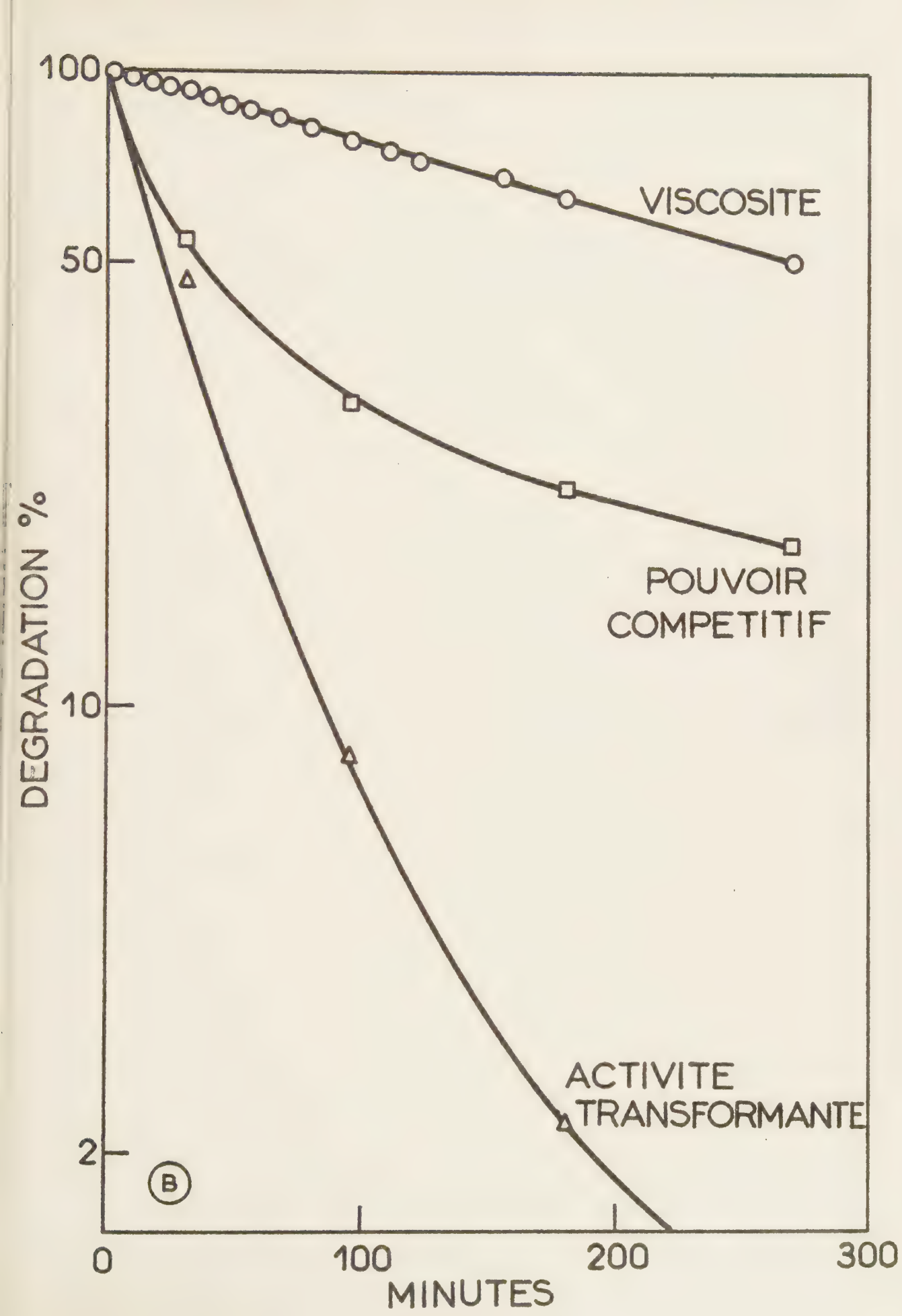
Tests de transformation :

ADN E = 1µg/ml milieu de transformation
ADN N = 8µg/ml
16µg/ml "
32µg/ml

Le pouvoir compétitif de l'ADN N a donc été testé à 3 concentrations d'ADN.

Activité transformante : du marqueur N de l'ADN $N_{2(A)}366$, soumis aux dégradations enzymatiques. Test à concentration saturante d'ADN.


100
50
10
2
DEGRADATION %
VISCOSITE
POUVOIR
COMPETITIF
ACTIVITE
TRANSFORMANTE
A
0
200
400
600
MINUTES


100
50
10
2
DEGRADATION %
VISCOSITE
POUVOIR
COMPETITIF
ACTIVITE
TRANSFORMANTE
B
0
100
200
300
MINUTES

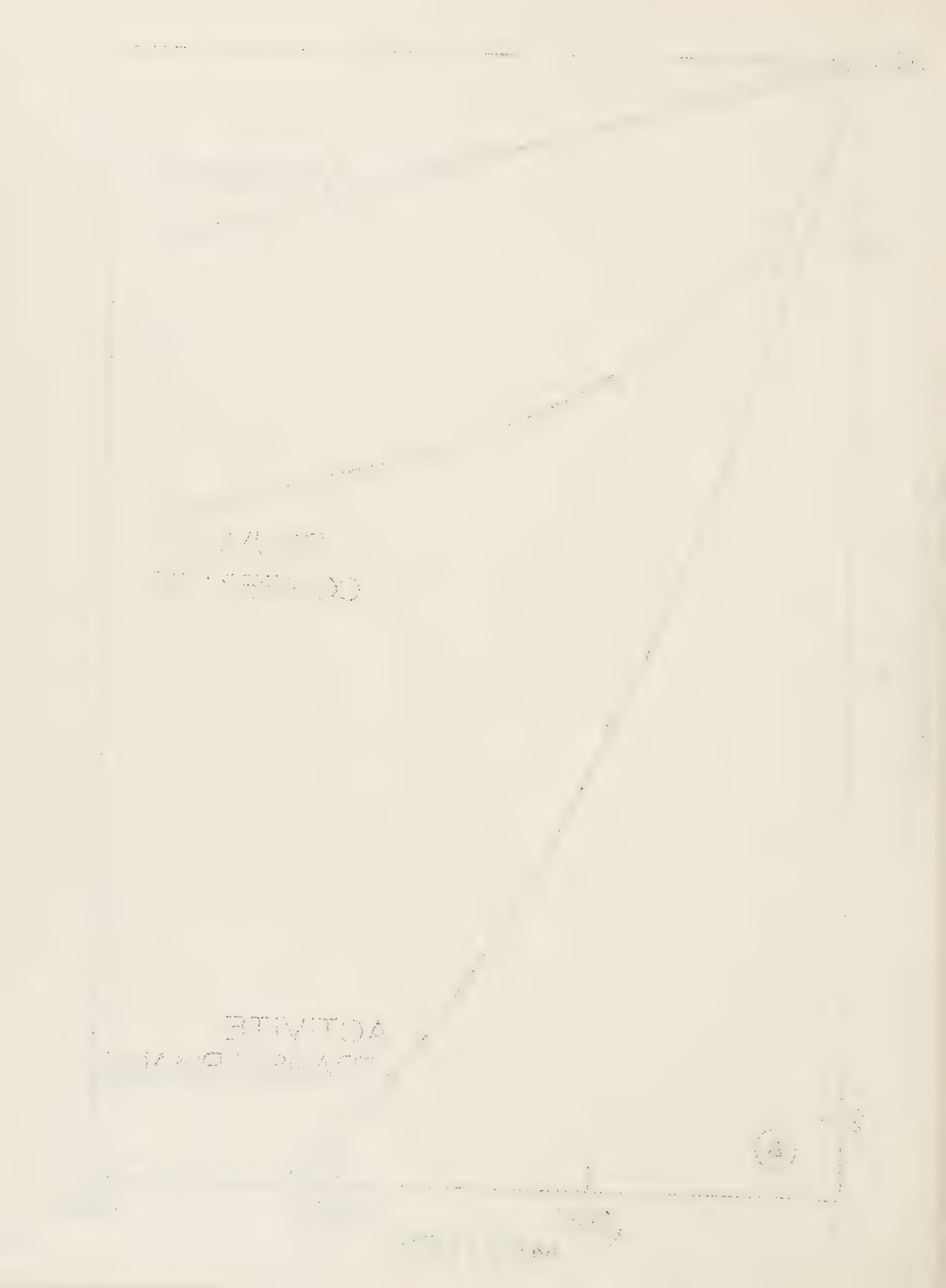


Figure 9

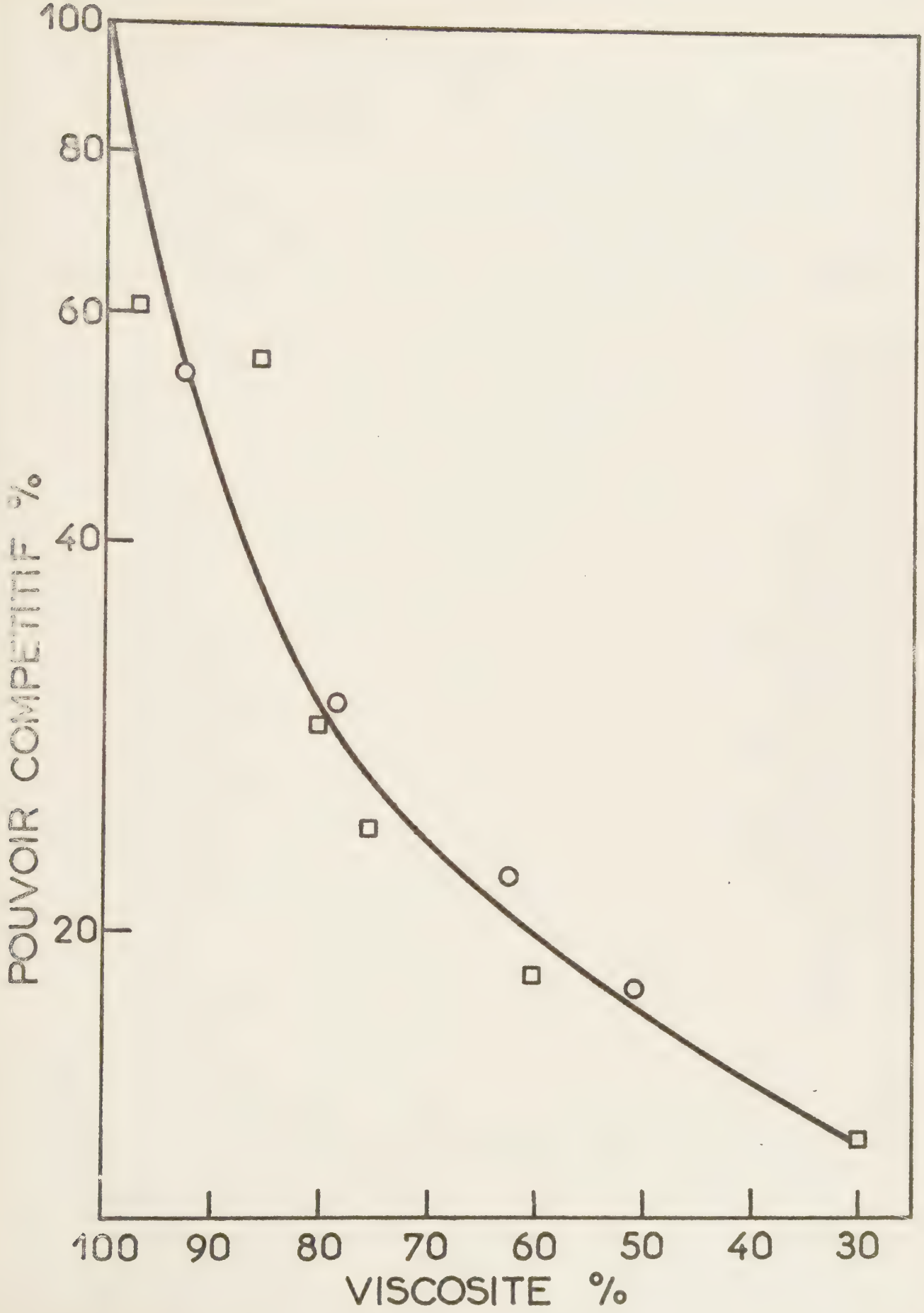
DIMINUTION DU POUVOIR COMPETITIF DE L'ADN TRANSFORMANT D'HEMOPHILE TRAITE PAR DNAse ACIDE ET PAR DNAse PANCREATIQUE.

---

En utilisant les données des figures 8, nous comparons, à mêmes valeurs de viscosité, l'effet des deux traitements enzymatiques sur le pouvoir compétitif de l'ADN.

Conditions de traitements de l'ADN $N_{2(A)}366$ : voir fig.8

Détermination du pouvoir compétitif de l'ADN: voir fig.8 (également texte, et "Méthodes expérimentales".)


100
80
60
40
20
POUVOIR COMPETITIF %
100
90
80
70
60
50
40
30
VISCOSITE %

La DNAse de Coli agit comme la DNAse acide par un double mécanisme, diplotomique et haplotomique. Le rapport des deux types de ruptures n'est pas connu ; mais le nombre relatif de ruptures haplotomiques ne serait pas important d'après les estimations toutefois assez sommaires, de F.W. STUDIER (1965)

Cette étude a confirmé nos interprétations antérieures. La figure 15 montre qu'à même chute de viscosité la DNAse de Coli est beaucoup moins inactivante que la DNAse acide.

Nous ne pouvons affirmer que le mécanisme d'action des deux enzymes repose sur un nombre équivalent de ruptures des 2 types; cependant si le nombre relatif des ruptures haplotomiques aux ruptures diplotomiques est supérieur à 1-4 pour la DNAse de Coli, il est d'autant plus en faveur d'un effet inactivant plus faible des ruptures formant des terminaisons 5'P. D'après les résultats de la figure 15 nous pouvons dire que, à même niveau de dégradation par les deux DNAses, la DNAse de Coli est 3o fois moins inactivante que la DNAse acide ; cette comparaison tient compte des résultats de l'inactivation la plus faible obtenue, par action de DNAse acide à pH5, sur la même préparation d'ADN.

## C.- POST-TRAITEMENT, PAR PHOSPHATASE, d'ADN TRAITE PAR DNAse ACIDE

L'effet inactivant particulier des extrémités 3'P se manifeste au cours de la deuxième phase de la transformation bactérienne, c'est-à-dire à l'intérieur de la cellule bactérienne.

L'interférence de ces extrémités inactivantes au cours des

différentes étapes subséquentes de la transformation pourrait se faire par deux mécanismes :

-1) les groupes phosphates 3' pourraient inhiber l'action d'un enzyme qui participe à la recombinaison des brins d'ADN appariés : ADN transformant et ADN bactérien; ils empêcheraient ainsi l'intégration de longs segments d'ADN portant des marqueurs génétiques intacts.

Ce phénomène serait similaire à l'inhibition de la DNA polymérase de E.Coli par de l'ADN template contenant des extrémités 3'P, introduites au préalable dans l'ADN par action ménagée de DNAse acide, ou de nucléase de Micrococque (C.C.RICHARDSON et Coll. 1963.

-2) après la pénétration de l'ADN, partiellement digéré par la DNAse acide, dans la bactérie réceptrice, une exonucléase pourrait attaquer l'ADN à partir des extrémités 3'P qui ont été formées et détruire ainsi des fragments importantsde l'ADN transformant.

Si c'est une exonucléase du type exonucléase III de Coli (I.R.LEHMAN 1963) ou de Pneumocoque (S.LACKS et B.GREENBERG 1967) qui est responsable de la dégradation ultérieure de l'ADN le post-traitement par phosphatase ne devrait pas modifier sensiblement l'activité transformante des marqueurs de l'ADN ; ces enzymes,en effet,peuvent attaquer tant les extrémités 3'OH que les extrémités 3'P.

Par contre l'élimination des groupes 3'P devrait selon la première hypothèse ramener l'effet inactivant de la rupture ainsi modifiée à celui d'une rupture analogue de DNAse de Coli.

Le post-traitement par phosphatase devrait donc nous permettre non seulement de confirmer l'effet particulièrement inactivant des terminaisons 3'P dans l'ADN, mais aussi de choisir parmi les deux mécanismes possibles celui par lequel se

Figure 1o

INACTIVATION COMPAREE DE L'ADN D'HEMOPHILE (MARQUEUR N) PAR LA DNAse ACIDE A pH 5 ET PAR LA DNAse DE COLI

---

Perte de l'activité transformante du marqueur N en fonction de la chute de viscosité de l'ADN.

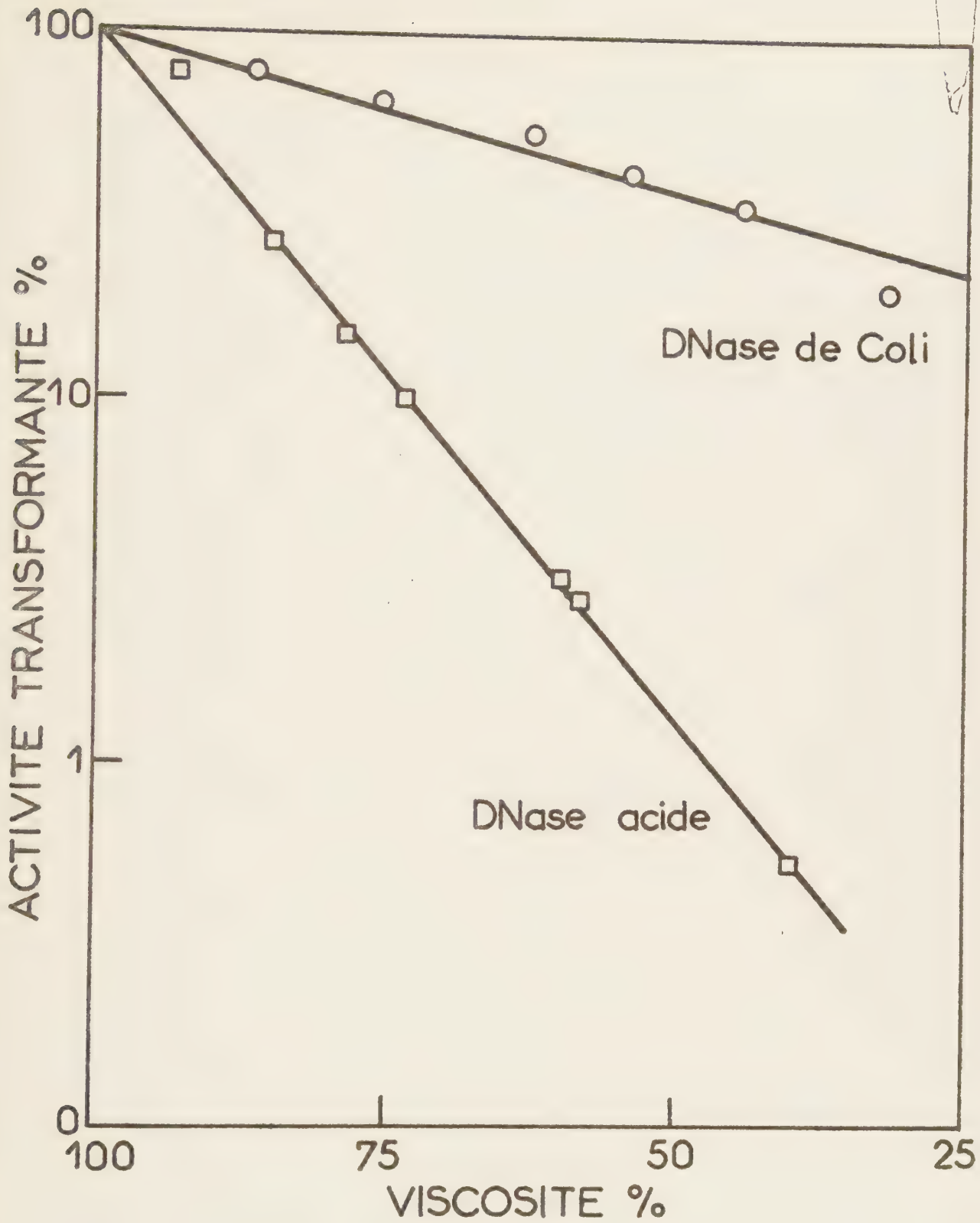
ADN utilisé : ADN $N_{2(A)}366$

Traitement par la DNAse acide à pH 5 : voir fig.1

Traitement par la DNAse de Coli : ADN 5oµg/ml +DNAse o,12mug/ml dans Tris o,o66M pH7,6+$MgCl_2$ o,oo6M

Viscosité : viscosité spécifique mesurée à un gradient de 57,5 $s^{-1}$

Activité transformante : du marqueur N, testée à concentration saturante d'ADN


100
10
1
0
ACTIVITE TRANSFORMANTE %
DNase de Coli
DNase acide
100
75
50
25
VISCOSITE %

manifeste cet effet inactivant.

Nos données expérimentales actuelles sont en faveur du premier mécanisme proposé. Nous avons en effet, après post-traitement de l'ADN par la phosphatase dans des conditions expérimentales[x] qui ne sont pas les conditions optimales d'action de la phosphatase, retrouvé une activité transformante de l'ADN double de l'activité résiduelle avant post-traitement. Par un traitement plus poussé (B.WEISS et C.C.RICHARDSON 1967) il est probable que l'effet réactivant de la phosphorylation puisse être augmenté.

Ces études qui sont d'un très grans intérêt, devront être poursuivies. Elles apportent des connaissances nouvelles sur le mécanisme de la recombinaison de l'ADN au cours de la transformation.

---

x ADN $N_2$(A) 366 50µg/ml + Phosphatase alcaline (Worthington BAPC $6L^2$A) 0,01µg/ml, dans Tris 0,1M pH8,6.

# CONCLUSIONS

Les enzymes dont nous avons étudié l'action sur l'ADN d'Hemophile sont des endonucléases. L'ADN subit de leur part exclusivement des ruptures de liaisons phosphoesters. Le nombre des ruptures des deux types : diplotomiques et haplotomiques, a été évalué au cours des cinétiques de dégradations que nous avons étudiées. Sur la base de ces données, concernant les modifications physico-chimiques de l'ADN par les DNAses, nous avons analysé l'inactivation de l'ADN par la DNAse acide. Les DNAses pancréatique et DNAse de Coli nous ont servi d'enzymes de référence. Les conclusions importantes de ce travail sont les suivantes:

1.- Rupture et Inactivation

a) Nous avons montré

- que l'effet inactivant des ruptures phosphoester est très différent selon la nature de ces ruptures : la DNAse acide, qui coupe la chaîne polynucléotidique en libérant des nucléosides terminaux 3'P est plus inactivante que les DNAse pancréatique et DNAse de Coli qui laissent des groupes terminaux desoxyribose-5'-phosphate.

- que l'on peut faire varier le rapport des ruptures haplotomiques aux ruptures diplotomiques que la DNAse acide produit sur l'ADN, en changeant les conditions opératoires de son action.

b) La cinétique d'inactivation des marqueurs de l'ADN

par la DNAse pancréatique peut s'expliquer aisément par un mécanisme direct de lésion des régions génétiques étudiées Nos données sur le nombre de ruptures responsables de l'inactivation de l'ADN par la DNAse acide, ne permettent par contre d'interpréter l'effet inactivant de ces ruptures que par une action à distance des lésions sur l'intégrité biologique des mêmes régions génétiques.

## 2.- Inactivation de l'ADN - Effet sur la liaison des marqueurs.

Nous avons comparé l'effet inactivant de la DNAse pancréatique et de la DNAse acide sur les marqueurs liés de l'Hemophile. La sensibilité relative des marqueurs aux deux traitements enzymatiques est similaire. Par contre l'effet de l'action des deux enzymes sur la liaison de ces marqueurs est différente.

Lorsque l'ADN est traité par la DNAse pancréatique, les lésions inactivantes mises en évidence dans les marqueurs étudiés (S et N) suffisnent à rendre compte de l'inactivation totale du segment d'ADN qui les porte. L'additivité des lésions des marqueurs est en accord avec un mécanisme de lésion directe des marqueurs.

Mais le taux d'inactivation des mêmes marqueurs par la DNase acide ne suffit pas à justifier l'inactivation importante que l'on observe lorsqu'on examine l'inactivation simultanée des marqueurs. Il apparaît,dans ce cas, un résultat expérimental attribuable à une déliaison des marqueurs étudiés; très faible dans les conditions opératoires à pH neutre, elle ne peut être contestée à pH5.

Nous avons vu que cet effet de séparation des marqueurs, ne peut être expliqué en termes simples de déliaison. Sur la base de nos résultats actuels nous avons proposé une inter-

prétation, sujette à vérification, selon laquelle les molécules d'ADN portant les deux marqueurs S et N seraient inactivées plus rapidement que les molécules portant seulement l'un de ces 2 marqueurs.

### 3.- Mécanisme de l'inactivation de l'ADN par la DNAse acide.

Nous avons précisé les points suivants :

a) Les lésions inactivantes produites par la DNAse acide n'inhibent pas la première phase de la transformation bactérienne.
La fixation des molécules d'ADN transformant sur les sites récepteurs bactériens dépend uniquement de la taille des molécules d'ADN. De faibles diminutions de leur taille touchent sensiblement leur pouvoir de pénétration dans les bactéries.
A ce niveau de la transformation bactérienne intervient donc l'effet dépolymérisant des traitements enzymatiques.
Les extrémités nucléosides-P formées par action des enzymes sur l'ADN, qu'elles soient très inactivantes (DNAse acide) ou très nombreuses (DNAse pancréatique), ne modifient pas les premières étapes de la transformation.

b) Les lésions de l'ADN interfèrent donc avec l'un des processus de la transformation qui ont lieu à l'intérieur de la cellule bactérienne. Des résultats préliminaires de post-traitement, par une phosphatase, d'ADN lésé montrent que l'activité transformante de l'ADN redevient supérieure si l'on enlève à l'ADN des groupes phosphate terminaux engagés dans les extrémités nucléosides 3'P. Ce groupe 3'P terminal pourrait bloquer un enzyme intervenant dans la recom-

binaison et empêcher ainsi l'intégration, dans le génome bactérien, de longs segments d'ADN portant des marqueurs actifs. Cette interprétation suggère une inactivation polaire de grands segments d'ADN.

# CONCLUSIONS GENERALES

La transformation de Hemophilus Influenzae a été utilisée comme technique d'étude de l'action inactivante de différents agents sur l'ADN. Les marqueurs liés S,K et N de l'Hemophile ont servi de cible à différents types de lésions produites par les agents inactivants:

- peroxydation des bases de l'ADN, et formation de ponts covalents entre ces bases, par l'acide persuccinique
- coupures de la molécule d'ADN par les ultra-sons.
- ruptures monocaténaires - ou haplotomiques - de liaisons phosphoesters par la DNAse pancréatique, laissant une extrémité nucléoside 5'P.
- ruptures haplotomiques et diplotomiques des chaînes de l'ADN par la DNAse acide, laissant des groupes terminaux nucléoside 3'P.

Certaines lésions ne sont pas inactivantes; d'autres ont un effet inactivant direct sur les marqueurs, ou même ont un effet à longue distance sur la molécule d'ADN.

Nous avons vu que seulement une modification de base sur quinze, dans le marqueur étudié, est inactivante pour le marqueur. Les bases sont modifiées in situ par l'acide persuccinique, et il apparaît dans l'ADN de l'hypoxanthine et de l'uracile. De nombreuses bases modifiées peuvent donc être intégrées dans l'ADN bactérien. Certaines d'entre elles seraient mutagènes.

Les scissions des chaînes polynucléotidiques de l'ADN inactivent les marqueurs génétiques lorsqu'il y a lésion di-

recte des segments d'ADN qui en constituent la cible d'intégration. Nous avons constaté qu'il faut une vingtaine de ruptures dépolymérisantes par molécule d'ADN de masse $M_w = 12.10^6$ pour que le marqueur N présente une lésion inactivante. Si nous comparons cet effet inactivant à celui des ruptures haplotomiques produites par la DNAse pancréatique, nous constatons qu'une double rupture de l'ADN par ultra-sons (rupture simultanée des deux brins de l'ADN) a un effet inactivant double par rapport à celui d'une simple rupture de DNAse pancréatique. En effet il faut une quarantaine de ruptures haplotomiques dans ce cas pour avoir le même effet inactivant.

L'effet inactivant des lésions n'est plus comparable lorsqu'on crée des ruptures dans l'ADN par la DNAse acide. Les ruptures des liaisons phosphoesters de l'ADN donnant lieu à la formation d'extrémités nucléosides 3'P, constituent une lésion particulièrement inhibitrice pour l'expression des caractères génétiques de l'ADN. Deux à quatre scissions d'un brin d'ADN dans la molécule suffisent pour que le marqueur N présente un taux d'inactivation équivalent à la présence d'une lésion léthale. Ces ruptures seraient donc 10 à 20 fois plus inactivantes que les ruptures de DNAse pancréatique et d'ultra-sons. Les lésions, de par les extrémités nucléosides 3'P qu'elles créent, donneraient lieu à une inactivation polaire de très longs segments d'ADN. L'inactivation dans ce cas ne peut être dûe à une lésion directe des marqueurs.

---

Nous avons vu que les lésions de l'ADN interfèrent avec l'un des mécanismes de la transformation qui ont lieu à l'intérieur de la cellule bactérienne. Il semble, d'après

notre étude de l'inactivation de l'ADN par la DNAse acide que l'interférence ait lieu au moment de l'intégration de l'ADN dans le génome bactérien récepteur.

Nos résultats d'inactivation, selon lesquels les ruptures diplotomiques ont un effet inactivant double des ruptures haplotomiques, sont en faveur de l'intégration d'un seul brin de l'Hemophile lors de la transformation

Nous avons, par ailleurs, mis en évidence un rôle particulier de la masse de l'ADN dans son efficacité de transformation. La dépolymérisation importante de l'ADN par les ultra-sons nous a permis de montrer que les processus de la transformation nécessitent la mise en présence d'ADN de masse égale ou supérieure à $1\text{-}2.10^6$ daltons. D'autre part si l'on mélange à un ADN de $12.10^6$ des échantillons d'ADN homologues dont la masse est à 9o% ...5o% ..etc...de la masse initiale (donc bien au dessus de la masse critique de $1\text{-}2.10^6$ daltons) nous constatons que les bactéries réceptrices choisissent, parmi les molécules en présence, celles dont la taille est la plus grande. C'est selon le critère de taille qu'à lieu le choix qui s'opère parmi les molécules d'ADN pour leur fixation sur les sites récepteurs bactériens. A ce sujet les résultats des tests de compétition d'ADN dégradé par ultra-sons et par DNAse acide sont en accord.
Par contre les lésions présentes dans l'ADN n'ont pas d'effet sur le pouvoir de pénétration des molécules dans les bactéries réceptrices.

---

Nous avons utilisé l'ADN d'Hemophile tout au long de ce travail. Certaines études comparatives nous permettent d'apporter quelques données nouvelles sur le système de transformation.

La sensibilité relative des marqueurs aux différents traitements que nous avons effectués sur l'ADN a été la suivante. Par rapport à la sensibilité du marqueur N, celle des marqueurs S et K

à l'action de l'acide persuccinique est égale à 1,96 et 1,6
" des ultra-sons " " 1,26 et 1,26
" des DNAses 1,3 et -

Il semble étonnant que la DNAse acide, comme les ultra-sons ou la DNAse pancréatique, ait un effet inactivant différent sur les deux marqueurs S et N, alors que son action inactivante est de très longue portée. Cette distinction pourrait provenir dans ce cas, de la différence de taille des molécules d'ADN portant seulement l'un de ces marqueurs.
Par contre l'acide persuccinique donne probablement un rapport de sensibilité des marqueurs qui est plus en relation avec les tailles respectives des segments génétiques correspondants.

J.H.STUY (1961) a évalué la taille de ces mêmes segments d'ADN. Nous rappellerons, à seul titre indicatif et de comparaison, que les marqueurs N et S apparaissent, d'après nos résultats d'inactivation par les ultra-sons et par la DNAse pancréatique comme ayant respectivement des masses de 600.000 et 750.000 (ultra-sons) et 280.000 et 410.000(DNAse)

Les marqueurs S,K et N sont liés.

Quelques soient les agents inactivants utilisés, les marqueurs proches S et K ont toujours présenté un effet de chevauchement par rapport aux lésions inactivantes. Une lésion d'acide persuccinique ou d'ultra-sons sur deux inactive à la fois les deux marqueurs. Nous pensons que cet effet est dû au proche voisinage des 2 marqueurs sur la molécule d'ADN et résulte de l'intégration de segments d'ADN assez longs lors

de la transformation bactérienne. (N.NOTANI, SH.GOODGAL 1966) Par contre les marqueurs S et N sont plus éloignés l'un de l'autre. L'essai de séparation des 2 marqueurs par les différents agents dépolymérisants utilisés n'a pas abouti. Les résultats obtenus sont discutés dans chaque chapitre s'y référant.

# BIBLIOGRAPHIE


ALEXANDER H.E., LEIDY G. - (1950)
Proc. Soc. Exptl. Biol. 73, 485.

ALLFREY V., MIRSKY A.E. - (1952)
J. Gen. Physiol., 36, 227.

AVERY O.T., Mc LEOD M. Mc CARTY M. - (1944)
J. Exptl. Med., 79, 137.

BACH M.L., LUZZATI D., CHEVALLIER M.R. - (1966)
Biochim. Biophys. Acta, 119, 75.

BARNHART B.J., HERRIOTT R.M. - (1963)
Biochim. Biophys. Acta., 76, 25.

BECKER E.F., ZIMMERMANN B.K., GEIDUSHECK E.P. (1964)
J. Mol. Biol., 8, 377.

BERNARDI G., SADRON Ch. - (1961)
Nature, 191, 809.

BERNARDI G., GRIFFE M. - (1964)
Biochemistry, 3, 1419.

BERNARDI G., SADRON Ch. - (1964a)
Conf. Baselli Milan 1963. Institut Lombard des Sciences et des Lettres, 62.

BERNARDI G., SADRON Ch. - (1964b)
Biochemistry, 3, 1411.

BERNARDI G. - (1964)
Biochem. Biophys. Res. Comm., 17, 573.

BERNARDI G. - (1965)
J. Mol. Biol., 13, 603.

BERNARDI G., APELLA A., ZITO R. - (1965)
Biochemistry, 4, 1725.

BERNARDI G., CORDONNIER C. - (1965)
J. Mol. Biol., 11, 141.

BERNARDI G., BERNARDI A., CHERSI A. - (1966)
Biochim. Biophys. Acta, 129, 1.

BERNS K.I., THOMAS Jr. C.A. - (1965)
J. Mol. Biol., 11, 476.

BLUM J. - (1959)
Thèse, Strasbourg.

BODMER W., GANESAN H.T. - (1964)
Genetics, 50, 717.

BODMER W. - (1966)
J. Gen. Phys. 49, 233.

BUC H. - (1965)
Biophys. J. (Abstr. Biophys. Soc. Suppl. 9th Ann. Meeting) W.G.I., 47.

CARRARA M., BERNARDI G. - (en préparation)

CAVALIERI L.F., ROSENBERG B.H. - (1958)
Proc. Nat. Acad. Sci., 44, 853.

CAVALIERI L.F. - ROSENBERG B.H. - (1961)
Biophysc J., 1, 323.

CHARLESBY A. - (1954)
Proc. Roy. Soc. (London) A 224, 120

CHEVALLIER M.R., LUZZATI D. - (1960)
C. R. Ac. Sci., 250, 1572.

CHEVALLIER M.R. - (1964)
Thèse, Strasbourg.

CHEVALLIER M.R., BERNARDI G. - (1965)
J. Mol. Biol., 11, 658.

CORDONNIER C., BERNARDI G. - (1965)
Biochem. J., 94, 12.

CORDONNIER C., BERNARDI G. - (1966)
Third FEBS Meeting, Varsovie

CRAMER F., SEIDEL H. - (1963)
Biochim. Biophys. Acta, 72, 157.

CRAMER F., SEIDEL H. - (1964)
Biochim. Biophys. Acta, 91, 14.

DICKEY F.H., CLELAND S.H., LOTZ C. - (1949)
Proc. Nat. Acad. Sci., 35, 581.

DOHERTY D.G., BURNETT Jr. W.T., SHAPIRA R. - (1957)
Rad. Reserarch, 7, 13.

DOHERTY D.G., SHAPIRA R., BURNETT Jr. W.T. - (1957)
J. Amer. Chem. Soc., 79, 5667.

DOTY P., BUNCE Mc GILL B., RICE S.A. - (1958)
Proc. Nat. Acad. Sci., 44, 432.

EIGNER J. - (1960)
Ph. D. Dissertation, Harward University Cambridge Mass. (U.S.A. )

EIGNER J., DOTY P. - (1965)
J. Mol. Biol., 12, 549.

EPHRUSSI-TAYLOR H. - (1968)
Recent Progress in Microbiology, Symposium 1, 51.

EPHRUSSI-TAYLOR H. - (1961)
J. Chimie Physique, 58, 1090.

FOX M.S., HOTCHKISS R.D. - (1957)
Nature, 179, 1322.

FOX M.S., ALLEN M.K. -b(1964)
Proc. Nat. Acad. Sci.,52, 412.

FRENKEL G. - (1940)
Acta Physicochimica U.R.S.S., 12, 1317

FREDERICQ E., OTH A., HACHA R. - (1958)
Biophys. Biochim. Acta, 29, 287.

FREESE E., BAUTZ-FREESE E. - (1966)
Rad. Rese arch, Supp. 6, 97

FROEHLICH D., STRAZIELLE C., BERNARDI G., BENOIT H. - (1963)
Biophys. J., 3, 115.

FRONTALI C. - (1962)
Nuovo Cimento (Supplément), 25, 41

GEIDUSHECK E.P. - (1961)
Proc. Nat. Acad. Sci., 47, 950.

GEIDUSHECK E.P. - (1962)
J. Mol. Biol., 4, 467.

GOODGAL S.H., HERRIOTT R.M. - (1957)
The Chemical Basis of Heredity (W.D. Mc Elroy et B. Glass) J. Hopkins Press Baltimore, 336.

GOODGAL S.H., HERRIOTT R.M. - (1957)b
Genetics, 42, 372.

GOODGAL S.H., HERRIOTT R.M. - (1961)
J. Gen. Physiol., 44, 1201.

GOODGAL S.H. - (1961)
J. Gen. Physiol., 45, 205.

GRIFFITH F. - (1928)
J. Hyg., 27, 113.

HERRIOTT R.M. - (1961)
J. Chimie Physique, 58, 1103.

HORN E.E., HERRIOTT R.M. - (1962)
Proc. Nat. Acad. Sci., 48, 1904.

HORN E.E., POSTEL E., GOODGAL S.H. - (1966)
J. Mol. Biol., 16, 317.

HOTCHKISS R.D. - (1954)
Proc. Nat. Acad. Sci., 40, 49.

KHYM J.X., SHAPIRA R., DOHERTY D.G. - (1957)
J. Am. Chem. Soc., 79, 5663.

KOERNER J.F., SINSHEIMER R.L. - (1957)
J. Biol. Chem., 228, 1049.

KROEPELIN H. - (1929)
Kolloïd Z., 47, 294.

LACKS S., GREENBERG B. - (1967)
J. Biol. Chem., 242, 3108.

LATARJET R. - (1956)
Ciba Symp. on Ionizing Radiations and Cell metabolisms.
275.

LATARJET R., REBEYROTTE N. DEMERSEMAN P. - (1958)
Peroxydes organiques en Radiobilogie, Masson Edt.

LEHMAN I.R., ROUSSOS G.G., PRATT E.A. - (1962)
J. Biol. Chem., 237, 819.

LEHMAN I.R. - (1963)
Progress in Nucleic Acid Rese arch, 2, 83.

LEIDY G., HAHN E. - (1954)
J. Expbl. Med., 99, 505.

LERMAN L.S., TOLMACH L.T. - (1957)
Biochim. Biophys. Acta, 26, 68.

LERMAN L.S., TOLMACH L.T. - (1959)
Biochim. Biophys. Acta, 33, 371.

LINEWAEVER H., BURK D. - (1934)
J. Amer. Chem. Soc., 56, 658.

LITMAN R.M. - (1961)
J. Chimie Physique, 58, 997.

LITT M., MARMUR J., EPHRUSSI-TAYLOR H. - (1958)
Proc. Nat. Acad. Sci., 44, 144.

LITT M., MARMUR J., EPHRUSSI-TAYLOR H., DOTY P. - (1958)
Biochemistry, 44, 144.

LITZLER R. - (1957)
Thèse, Strasbourg.

LITZLER R., CERF R., SADRON Ch. - (1964)
C.R. Acad. Sci., 259, 473.

LUZZATI D., CHEVALLIER M.R. - (1957)
Ann. Institut Pasteur, 93, 366

LUZZATI D., SCHWEITZ H., BACH M.L., CHEVALLIER M.R. - (1961)
J. Chim. Phys., 58, 1021.

LUZZATI D. - (1962)
Biochem. Biophys. Res. Comm., 9, 508.

Mc HATTIE L.A., BERNS K.I., THOMAS Jr. C.A. - (1965)
J. Mol. Biol., 11, 648.

NOTANI N., GOODGAL S.H. - (1966)
J. Gen. Phys., 49, 197.

RAMACHANDRAN L.K., FRAENKEL-CONRAT - (1958)
Arch. Biochem. Biophys., 74, 224.

RICHARDS O.C., BOYER P.D. - (1965)
J. Mol. Biol. 11, 327.

RICHARDSON C.C., SCHILDKRAUT C.L., APOSHIAN H.V., KORNBERG A., BODMER W.F., LEDERBERG J. - (1963)
Informational Macromolecules Vogel H.J., Bryson V. et Lampen J.O. (Edts). - Academic Press N.Y.

SCHAEFFER P. - (1957)
C.R. Acad. Sci., 245, 230.

SCHAEFFER P. - (1958)
Symposium Soc. Exp. Biol. N° 12 , The biological replication of Macromolecules (London).

SCHAEFFER P. - (1961)
Thèse, Paris.

SCHUMACKER V.N., RICHARDS E.G., SCHACHMAN H.K. - (1956)
J. Amer. Chem. Soc., 78, 4230.

SCHWEITZ H. - (1967)
Thèse, Strasbourg.

SHAPIRA R., DOHERTY D.G., BURNETT Jr. W.T., - (1957)
Radiation Research 7, 22.

SINSHEIMER R.L., KOERNER J.F. - (1951)
Science, 114, 42.

SINSHEIMER R.L. - (1954)
J. Biol. Chem., 208, 445.

SPENCER H.T., HERRIOTT R.M. - (1965)
J. of Bacteriol. 90, 911.

SPIZIZEN J. - (1958)
Proc. Nat. Acad. of Sci., 44, 1072.

SPIZIZEN J;, REILLY B.E., EVANS A.H. - (1966)
Ann. Rev. Microbiol., 20, 371.

STONE W.S., WYSS O., HAAS F. - (1946)
Proc. Nat. Acad. Sci., 33, 59.

STUDIER F.W. - (1965)
J. Mol. Biol. 11, 373.

STUY J.H. -1961a) Thèse
Thèse Utrecht.

STUY J.H. - (1961b)
Biochem. Biophys. Res. Comm., 6, 328.

STUY J.H. - (1962)
J. Photochem. Photobiol., 1, 41.

THOMAS C.A., - (1956)
J. Amer. Chem. Soc., 78, 1861.

WEISS B., RICHARDSON C.C. - (1967)
Proc. Nat. Acad. Sci., 1021.

WEISS J. - (1944)
Nature, 153, 748.

WEISSLER A.J. - (1955)
Iccoust. Soc. Amer., 25, 651.

WIPPLER C., SCHEIBLING G. - (1954)
J. Chim. Phys., 51, 201.

WYSS O., STONE W.S., CLARK J.B. - (1947)
J. Bact., 54, 767.

WYSS O., CLARK J.B., HAAS F., STONE W.S. - (1948)
J. Bact., 56, 51.

WYSS O., HAAS F., CLARK J.B., STONE W.S. - (1950)
J. Cell. Comp. Phys., 35 suppl. 1, 133.

YOUNG E.T., SINSHEIMER R.L. - (1965)
J. Biol. Chem., 240, 1274.

ZAMENHOF S., ALEXANDER H.E., LEIDY G. - (1953)
J. Exptl. Med. 98, 373.

ZAMENHOF P.J. - (1957)
The Chemical Basis of Heredity, 351.

ZIMM B.H. - (1948)
J. Chim. Phys., 16, 1093.